

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum der
Ludwig-Maximilian-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

Die Rolle von plasmatischem Fibronectin und Mitgliedern der Vegf-Familie in der Entwicklung pulmonaler Metastasen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Daniel Markwardt
aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Georg Enders

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Barbara Mayer
Prof. Dr. Alexander Dietrich

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: - / -

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen
Prüfung: 21.11.2013

Eidesstattliche Versicherung

Markwardt, Daniel

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Die Rolle von plasmatischem Fibronectin und Mitgliedern der Vegf-Familie in der Entwicklung pulmonaler Metastasen“

selbstständig verfasst, mich außer den angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Bedeutung von Krebserkrankungen	1
1.2	Phasen der Metastasierung	2
1.3	Das Konzept der Nische in der Metastasierung	4
1.3.1	Endothel	5
1.3.2	Tumorzelle	7
1.3.3	Thrombozyten	8
1.3.4	HPCs und die Prämetastatische Nische	9
1.3.5	VEGF-A	11
1.3.6	Fibronectin	13
1.4	Fragestellung	16
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Versuchsablauf zur Metastasierung in-vivo	19
2.1.1	Tumorzellen	19
2.1.1.1	Zellkultur	19
2.1.1.2	Transfektion mit siRNA	19
2.1.1.3	Charakterisierung der Tumorzellen (Genexpressionsarray)	20
2.1.2	Versuchstiere	20
2.1.3	Versuchsdurchführung	20
2.2	Makroskopische Auswertung	21
2.3	Mikroskopische Auswertung	22
2.4	Western Blot	24
2.5	ELISA	25

2.6	Durchflusszytometrie	26
2.7	Molekularbiologische Auswertung	26
2.7.1	Agarosegel – Elektrophorese	26
2.7.2	RNA – Isolierung	27
2.7.3	cDNA-Synthese.....	28
2.7.4	PCR	28
2.7.5	DNA-Isolierung.....	29
2.8	Graphische Darstellung und statistische Auswertung der Daten.....	30
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	Die Bedeutung von VEGF-A und PlGF für die Ansiedlung	metastasierender Tumorzellen.....33
3.1.1	Lokale Verfügbarkeit von VEGF-A.....	33
3.1.1.1	Verlauf der VEGF-A-Konzentration im Plasma nach	Tumorzellinjektion.....34
3.1.1.2	VEGF-A-Produktion in der Lunge und in den Tumorzellen	34
3.1.1.3	Verlauf der Pmel17-Expression nach Tumorzellinjektion.....	35
3.1.2	Versuche mit siRNA gegen VEGF-A	36
3.1.2.1	Charakterisierung der transfizierten Tumorzellen.....	36
3.1.2.2	Metastasierungsversuch in-vivo	37
3.1.2.3	Anstieg der PlGF-Produktion unter siRNA/VEGF-A-Behandlung	40
3.1.3	Versuche mit siRNA gegen PlGF	41
3.1.3.1	Charakterisierung der transfizierten Tumorzellen.....	41
3.1.3.2	Metastasierungsversuche in-vivo	42
3.1.4	Versuche mit siRNA gegen VEGF-A und PlGF	43
3.1.5	Versuche zu frühen Zeitpunkten der Metastasierung.....	45
3.1.5.1	Untersuchung der Vorgänge in der Lunge	47
3.1.5.2	Untersuchungen in Leber und Milz.....	53
3.2	Die Bedeutung von Fibronectin für den Vorgang der Metastasierung.....	58
3.2.1	Verifizierung eines pFn – Knockout	60

3.2.2	Metastasierungsversuch in-vivo	61
3.2.3	Untersuchung von Leber, Milz und Niere	63
3.2.4	Untersuchung zu frühen Zeitpunkten	64
3.2.4.1	cDNA – Analysen	65
3.2.4.1.1	Pmel.....	65
3.2.4.1.2	Marker unspezifischer Entzündung.....	67
3.2.4.1.3	Marker spezifischer Immunabwehr.....	69
3.2.4.1.4	Marker Nischen-assoziiierter Faktoren	70
3.2.4.2	Proteinbestimmung in der Lunge.....	73
3.2.4.3	Mikroskopische Analysen.....	74
3.2.5	FACS-Analyse zur Bindung von pFn an D5 - Melanomzellen	77
3.3	Expressionsarray der D5-Melanomzellen	79
4	DISKUSSION	81
4.1	Von Tumorzellen produziertes VEGF-A unterstützt die Metastasenbildung.....	81
4.2	Blockade der VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen führt zu einer Erhöhung der PlGF-Sekretion.....	88
4.3	Tumorzelleigenes PlGF ist entscheidend an der Ausbildung von Metastasen beteiligt	91
4.4	Plasmatisches Fibronectin ist entscheidend an der Ansiedlung von Tumorzellen beteiligt.....	101
4.4.1	Transport der Tumorzelle mit dem Blutfluss.....	104
4.4.2	Adhäsion der Tumorzelle.....	105
4.4.3	Intravasales Überleben und Invasion der Tumorzelle	112
4.5	Abschließender Überblick.....	118
5	ZUSAMMENFASSUNG	125

6	LITERATURVERZEICHNIS	129
7	ANHANG	145
7.1	Liste der verwendeten Materialien	145
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	148
7.3	Abbildungsverzeichnis	153
7.4	Tabellenverzeichnis	156
7.5	Primersequenzen	157

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Krebserkrankungen

„Es ergibt sich also [...], dass die Krebskrankheit auf dem Wege ist eine Volkskrankheit zu werden.“¹ Mit diesen vorausschauenden Worten eröffnete der deutsche Mediziner Ernst von Leyden im Jahre 1900 das „Comité für Krebsforschung“ in Berlin, was gleichzeitig den Beginn der organisierten Krebsforschung nicht nur in Deutschland bedeutete.

Die Erkrankung als solche war keineswegs neu aufgetreten, sondern war als oftmals tödliches Schicksal schon lange Zeit bekannt. So zeigt beispielsweise ein archäologischer Fund sogar einen Jahrtausende alten Fall eines Meningeoms.² Später – zur Zeit der Antike – waren es dann die griechischen Mediziner, die sich im Zuge ihrer Untersuchungen, vermutlich durch aufgestaute Venen bei einem Mamma-Karzinom, an einen „Krebs“ – griechisch: karzinos – erinnert fühlten und somit für die Namensgebung verantwortlich waren.³ Jedoch spielte Krebs als klassische Krankheit des hohen Alters auf Grund der geringen Lebenserwartungen im Laufe der Geschichte nur eine untergeordnete Rolle. Zu Lebzeiten von Leydens aber war Krebs inzwischen, vor allem durch die stetige Eindämmung der Infektionskrankheiten, immerhin schon für jeden zehnten Todesfall ursächlich.³ Nichtsdestotrotz beeindruckt die Weitsichtigkeit von Leydens, dessen Vorhersage sich bis heute in vollem Umfang bestätigt hat. So waren die Krankheiten unter dem Überbegriff der Neubildungen im Jahre 2007 mit circa 26 % die Todesursache Nummer zwei in Deutschland⁴ und werden bei gleich bleibenden Tendenzen in ungefähr 15 bis 20 Jahren sogar an erster Stelle stehen³. Auch global nimmt die Bedeutung immer weiter zu: Nach einer Schätzung der WHO wird die weltweite Anzahl der Todesfälle, mittelbar und unmittelbar durch Krebs verursacht, von acht auf bis zu zwölf Millionen pro Jahr ansteigen.⁵

Bei der Suche nach Ansätzen zur Verhinderung dieser Entwicklung, der Suche nach Therapiemöglichkeiten also, ist es von großer Bedeutung zu verstehen, warum eine Krebserkrankung so oft tödlich verläuft. Ähnlich wie bei gutartigen Geschwülsten stellt ein solider Primärtumor zunächst nur ein mechanisches Problem dar, das, abhängig vom

möglichen Ausdehnungsraum des Gewebes, in dem sich der Tumor befindet, als unterschiedlich kritisch zu bewerten ist. Selbstverständlich geht auch von einer möglichen Invasivität eines Malignoms eine erhebliche Gefahr aus. Dennoch können heute durch verbesserte diagnostische Möglichkeiten, im Sinne einer genauen Bildgebung, sowie durch präzise chirurgische Eingriffe eine Vielzahl der Primärtumoren beherrscht werden, sofern das Stadium noch nicht zu weit fortgeschritten ist.

Der heute noch weitestgehend unbeherrschte Faktor und damit wohl das derzeitige Hauptproblem der Krebserkrankung ist die Metastasenbildung, also die Absiedlung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor mit anschließender Bildung eines Sekundärtumors an entfernter Stelle im Körper. Hat ein Tumor erst einmal begonnen zu metastasieren, sind Anzahl und Lokalisation der neoplastischen Läsionen im Körper in der Regel kaum noch zu überblicken und ebenso wenig zu beherrschen. So wird davon ausgegangen, dass bei einer tödlich verlaufenden Krebserkrankung in 90 % der Fälle die Metastasenbildung ursächlich für den fatalen Ausgang ist.⁶ Wer also nach Ansätzen zur Eindämmung der Krebssterblichkeit sucht, sollte sich mit dem Vorgang der Metastasierung beschäftigen.

1.2 Phasen der Metastasierung

Die Metastasierung von Tumorzellen ist ein komplexer, mehrstufiger und insgesamt äußerst ineffektiver Prozess, an dessen Ende erst, nach erfolgreichem Durchlaufen der einzelnen Phasen, die Bildung einer klinisch sichtbaren Metastase steht.⁷

Der Vorgang der Metastasierung beginnt mit der Loslösung von Tumorzellen vom Primärtumor, entweder einzeln oder in Zellkohorten.⁸ Ein Schlüsselschritt der Mobilisation besteht dabei in der Auflockerung von Zell-Zell-Kontakten.⁹ In der Umgebung des Tumors kommt es mit Hilfe von Matrixmetalloproteinasen zu Strukturveränderungen in der EZM, wodurch der Tumorzelle die Mobilisation erleichtert wird und sie schließlich in Lymph- oder in der Regel venöse, selten arterielle, Blutgefäße eindringen kann.^{8, 10}

Für die wandernde Tumorzelle stellt das Blut auf Grund von einwirkenden Scherkräften, fehlendem Zellkontakt zur EZM und dem Angriff durch Immunzellen ein

nur wenig komfortables Milieu dar.^{6, 11-13} Dementsprechend zeigen eine Reihe von Studien, dass der Großteil der Tumorzellen, die in das Gefäßsystem gelangen, innerhalb von 24 Stunden abstirbt.^{7, 12} Wird der Transport im Blutstrom überstanden, so hat die Tumorzelle die Möglichkeit, im Kapillarsystem eines Sekundärorgans zu adhären und sich anzusiedeln. Dabei ist für die Lokalisation der Metastasen in erster Linie die anatomische Anordnung der Blutgefäße, in Verbindung mit den Größenverhältnissen von Tumorzelle (ca. 20µm) und Kapillare (Durchmesser ca. 3-8µm), verantwortlich.¹¹ Doch auch in nachgeschalteten Organen kommt es zum Auftreten von Metastasen. Hier zeigt sich oft ein von der Tumorentität abhängiges Verteilungsmuster. Das heißt die Voraussetzungen des Zielorgans und der Tumorzellen müssen zueinander passen, damit es zu einer erfolgreichen Ansiedlung kommen kann. Dies entspricht einer Theorie, die schon im Jahre 1889 von Stephen Paget unter dem Schlagwort der „seed and soil“-Hypothese veröffentlicht wurde und bis heute in ihrer Form weitestgehend Bestand hat.¹⁴

Ein letzter entscheidender Schritt, damit aus einer Tumorzellansiedlung eine manifeste Metastase werden kann, besteht in der Neubildung von Blutgefäßen. Ohne Angiogenese ist davon auszugehen, dass die Größe einer Metastase auf wenige Millimeter beschränkt bleibt.^{15, 16} Dieser letzte Abschnitt ist einer der kompliziertesten und zugleich auch ineffektivsten der gesamten Metastasierungskaskade. So verbleiben bis zu 99% der Tumorzellen zunächst ohne Angiogenese und somit als „dormant cells“ klinisch stumm.⁶

In jeder der Phasen der Metastasierung sind sehr spezifische Anforderungen an die Tumorzelle gestellt und folglich auch in jedem davon Ansatzpunkte für eine gezielte Forschung nach Therapiemöglichkeiten zu finden. In dieser Arbeit soll es nun im Weiteren um die Vorgänge gehen, die sich von der Anlagerung der Tumorzelle an das Gefäßendothel bis zur Ausbildung einer Mikrometastase abspielen: eine Phase der Metastasierung, die sich im Tiermodell sehr gut durch i.v.-Injektion simulieren lässt und die durch die Erreichbarkeit der Tumorzellen im Blutstrom auch für eventuelle therapeutische Interventionen hervorragend geeignet ist.

1.3 Das Konzept der Nische in der Metastasierung

Nur ein sehr geringer Anteil der sich im Blutstrom befindenden Tumorzellen führt auch zur Ausbildung von Mikrometastasen, was in mehreren experimentellen Studien gezeigt werden konnte.^{7, 12, 15} So können im Blut von Krebspatienten viele Tumorzellen nachgewiesen werden, von denen allerdings nur ein Bruchteil überleben und sich in einem fremden Gewebe einnisten wird.¹⁷ Dies zeigt die enorme Ineffektivität der Metastasierung. Dennoch schaffen es zum Leidwesen der Patienten immer wieder einige – wenn auch nur sehr wenige – Tumorzellen, die Anforderungen von der Adhäsion ans Gefäßendothel bis zur Ausbildung einer Mikrometastase zu erfüllen. Die entscheidende Frage dabei ist, welchen Vorteil diese wenigen Tumorzellen gegenüber den vielen anderen hatten, die es nicht geschafft haben. Oder allgemein formuliert: Welche Faktoren sind für Tumorzellen im Gefäßbett vor Ort fürs Überleben entscheidend? Es ist offensichtlich, dass das Vorhandensein der Tumorzelle allein für eine erfolgreiche Metastasierung nicht ausreicht. Vielmehr muss sich die Tumorzelle vor Ort, unter Miteinbeziehung verschiedener Zellen und Faktoren, ein Milieu und einen Raum schaffen, der ihr das Überleben ermöglicht. Dieser geschaffene Raum wird als metastatische Nische bezeichnet.

Für die mögliche Beteiligung am Aufbau der Nische wird eine Vielzahl an Zelltypen und Plasmabestandteilen in Betracht gezogen und noch längst ist kein abschließendes Konzept hierzu vorhanden. Durch aktuelle Forschung werden immer wieder neue Erkenntnisse geliefert, die das Zeichnen eines Gesamtbildes schwierig erscheinen lassen. Dennoch soll im Folgenden versucht werden, die für die Bildung der Nische wichtigsten Einflussgrößen zu benennen und zu erläutern. Zur Veranschaulichung der Situation dient Abb. 1.1.

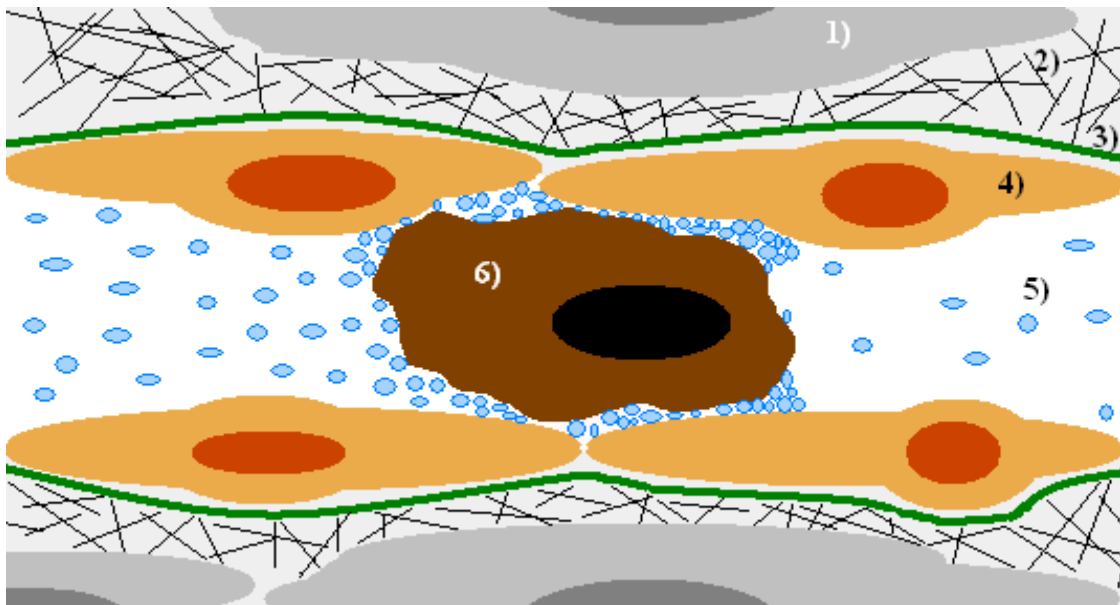


Abb. 1.1: Schematische Abbildung einer metastatischen Nische 1)Fibroblast, 2)Extrazelluläre Matrix, 3)Basalmembran, 4)Endothelzelle, 5)Thrombozyten, 6)Tumorzelle

In der Abbildung sind einige Faktoren gezeigt, die unmittelbar an der ersten Adhäsion beteiligt sind: Die Tumorzelle, die Endothelzellen, sowie aus dem Blutstrom die Thrombozyten. Hinzu kommen lösliche Faktoren im Blut wie VEGF-A (vascular endothelial growth factor a) und plasmatisches Fibronectin. Neben den hier aufgeführten Zellen kommen auch HPCs (hematopoietic precursor cells / Hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark) als unmittelbar Beteiligte in Betracht, deren Bedeutung für die Ausbildung einer metastatischen Nische vor allem durch Kaplan et al. gezeigt werden konnte.¹⁸ Auf die genaue Rolle der genannten Faktoren wird nun im Folgenden einzeln eingegangen, wohl wissend, dass die meisten der Effekte nur im Wechselspiel untereinander zu Stande kommen und auch nur so zu verstehen sind.

1.3.1 Endothel

Spätestens seit Stephen Paget im Jahre 1889 seine „seed and soil“-Hypothese veröffentlichte, ist das Phänomen der Organselektivität von Metastasen bekannt.¹⁴ Mit der Zeit konnte durch modernere wissenschaftliche Methoden die enorme Bedeutung eines empfänglichen „Bodens“ für die „Saat“ in Form der Tumorzelle immer wieder bestätigt werden. So führt zum Beispiel die Injektion von Tumorzellen ins arterielle Stromgebiet in den nachgeschalteten Organen nicht immer zu einem

Metastasierungsmuster, das man auf Grund der Durchblutungsverhältnisse erwarten würde,¹⁹ sondern einzelne Organe scheinen für die Ansiedlung von Tumorzellen besser geeignet zu sein als andere. Da bei diesen Versuchen in allen Organen genetisch gleiche Tumorzellen ankommen⁷ und auch die Bedingungen des Blutes überall als gleich angenommen werden dürfen, bleibt als einzig variabler Faktor, der die bevorzugte Ansiedlung und damit die bessere Bildung von metastatischen Nischen an bestimmten Stellen erklären kann, das Organ selbst. Es stellt sich nun die Frage, wie das Organ die Nischenbildung genau beeinflussen kann:

Die erste Barriere des Organs ist das Endothel. Wie auf Abb. 1.1 zu sehen ist, steht die Tumorzelle zunächst einer geschlossenen Endothelschicht gegenüber, bevor sie überhaupt an die EZM oder auch an Parenchymzellen des Organs gelangen kann. Dieses Hindernis scheint nur schwer überwindbar zu sein; jedenfalls weiß man, dass eine verletzte Endothelschicht, bei der die Tumorzellen direkten Kontakt zur EZM haben, die Bildung von Metastasen wesentlich erleichtert.^{20, 21} Allerdings muss im Regelfall von einem intakten Endothel ausgegangen werden. In dieser Situation haben, neben dem mechanischen Steckenbleiben, auch Adhäsionsmoleküle auf der Endothelzelloberfläche signifikanten Einfluss auf das Verbleiben und Überleben der Tumorzelle vor Ort.²² So führt eine Hochregulierung von E- und P-Selektinen, zum Beispiel nach Injektion von Il-1 oder Tnf α , zu einer Steigerung der Metastasenzahl.^{23, 24} Im Gegenzug kann ein gegen E-Selektin gerichteter Antikörper eine Adhäsion von Tumorzellen am Endothel blockieren.²⁵ Neben den Selektinen haben auch Integrine enorme Bedeutung für die Nischenbildung. Während Selektine dabei wohl eher für den initialen Arrest der Tumorzelle verantwortlich sind, haben letztgenannte ihren Einfluss mehr auf die spätere Phase der Adhäsion und die Invasion.²² Zusammen zeigt sich, dass die Wahrscheinlichkeit zur Bildung einer Nische also direkt von den Oberflächeneigenschaften der Endothelzellen abhängig ist. Interessanterweise sind diese Selektin- und Integrinmuster der Endothelien nun in den einzelnen Organen durchaus unterschiedlich,^{7, 26, 27} was eine gute Erklärung für die beschriebene Organspezifität von Metastasen liefert. Nur wenn die Selektine und Integrine in einem bestimmten Organ die Oberflächenmoleküle der Tumorzelle erkennen, kann die Tumorzelle am Endothel adhären und sich eine Nische bilden.

Die Endothelschicht ist für die Tumorzellen also in erster Linie ein Hindernis. Dennoch schafft sie mit ihren Adhäsionsmolekülen die Voraussetzungen für die Bildung metastatischer Nischen. Im Zusammenspiel mit den Eigenschaften der Tumorzellen erweisen sich diese als ein mehr oder weniger günstiger Boden für die Ansiedlung. Schließlich liegt damit in der Diversität der einzelnen Organendothelien eine Erklärung für das organspezifische Auftreten von Metastasen.

1.3.2 Tumorzelle

Selbstverständlich haben auch die Eigenschaften der Tumorzelle ganz entscheidenden Einfluss auf die mögliche Bildung einer Nische. Dabei kann die Tumorzelle passiv und aktiv, für sich selbst oder für nachfolgende Tumorzellen, zur Nischenbildung beitragen. Als passiv werden unter anderem die vorhandenen Oberflächenmoleküle der Tumorzelle bezeichnet. Wie schon erwähnt, sollte das Muster an Rezeptoren zu dem der Endothelien passen, um eine Ansiedlung zu erleichtern. So fördert die Expression von bestimmten Integrinrezeptoren auf den Tumorzellen, beispielsweise VLA-4 bei Melanomzellen, die Adhäsion an Endothelzellen, welche die entsprechenden Integrine besitzen, in diesem Fall das VCAM-1 auf den Lungenendothelien.²⁸ Die genetischen Voraussetzungen der Tumorzelle sind also im Zusammenspiel mit denen des Endothels entscheidend für das Auftreten und die Lokalisation von Metastasen.^{29, 30}

Ein weiterer Aspekt der Einflussnahme der Tumorzellen auf die Metastasierung erfolgt durch die Aktivierung von Thrombozyten. So können Tumorzellen, die durch die Expression von bestimmten Integrinen ein erhöhtes Aggregationspotential besitzen, auch vermehrt Metastasen ausbilden.³¹

Als aktiver Beitrag wird hier die sekretorische Leistung der Tumorzellen bezeichnet. Durch die Produktion und Abgabe einer Vielzahl von Faktoren und Stoffen soll das Endothel, als primäres Hindernis, auf eine bessere Adhäsion vorbereitet werden. Alternativ soll das Endothel insoweit beschädigt werden, dass die Tumorzelle unmittelbaren Kontakt zur Basalmembran oder EZM erlangt. Dies geschieht unter anderem durch die Sezernierung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie H₂O₂, durch Aktivierung von MMPs oder auch durch Abgabe von Wachstumsfaktoren wie VEGF-A und PlGF (Placenta growth factor), auf deren genaue Funktion später noch eingegangen werden wird.^{21, 32-35}

Diese Beispiele verdeutlichen, dass es Tumorzellen möglich sein kann, durch die Freigabe von Mediatoren aktiv Lücken im Endothel und der Basalmembran zu schaffen und dadurch eine Nischenbildung enorm zu fördern. Doch es gibt daneben auch Mechanismen, die dieses Ziel unter Miteinbeziehung des Endothels erreichen. Eine Möglichkeit dazu besteht in der Induktion einer Entzündungsreaktion. Wie unter 1.3.1 beschrieben reagiert das Endothel auf Entzündungsfaktoren mit einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, was eine Ansiedlung natürlich begünstigt. Auf drei verschiedene Arten kann die Tumorzelle das erreichen: Zunächst kann sie eine Entzündungsreaktion durch eigene Produktion von Interleukinen direkt auslösen.³⁶⁻³⁸ Dann besteht die Möglichkeit andere Zellen dazu zu stimulieren ihrerseits Entzündungsmediatoren wie Interleukine oder Tnf α abzugeben und so das Endothel zu aktivieren.³⁹ Zuletzt können Tumorzellen, die es selbst nicht schaffen, eine Nische auszubilden, durch ihre Anwesenheit und ihr Absterben zu entzündlichen Reaktionen am Endothel führen und so die Adhäsion nachfolgender Tumorzellen begünstigen.^{40, 41}

Die Tumorzelle ist also selbst am Ausbau einer metastatischen Nische beteiligt. Ob ihre Rolle nun als passiv oder aktiv beschrieben wird, es wird auf jeden Fall deutlich: Die genetischen Voraussetzungen der Tumorzelle spielen, neben der reinen physischen Präsenz, eine ganz erhebliche Rolle bei der Frage, ob sich eine Nische ausbilden kann und wenn ja, in welchem Organ sich diese am ehesten entwickeln wird.

1.3.3 Thrombozyten

In Abb. 1.1 wird schematisch die Adhäsion der Tumorzellen und somit der Beginn der Nischenbildung dargestellt. Diese Vorgänge finden im Gefäßlumen, also unter Anwesenheit der verschiedenen Bestandteile des Blutes statt, wodurch diese das Geschehen natürlich mit beeinflussen können. Besondere Bedeutung kommt dabei den Thrombozyten zu, die durch eine Verbindung mit den Tumorzellen aktiviert werden und in der Folge aggregieren können.⁴² Entsprechend findet sich eine Vielzahl an Studien, die eine entscheidende Rolle der Thrombozyten für die Ansiedlung von Tumorzellen belegen. So zeigen zum Beispiel diejenigen Tumorzelllinien, die ein stärkeres Aggregationspotential besitzen, auch eine vermehrte Ausbildung von Metastasen.⁴³⁻⁴⁶ Auf der anderen Seite kann in Experimenten die Anzahl der sich entwickelnden Metastasen durch Gabe von Medikamenten, die eine Aktivierung der

Thrombozyten blockieren, drastisch reduziert werden.^{47, 48} Ganz offensichtlich also unterstützen die Thrombozyten die Tumorzellen auf dem Weg zu einer Metastase. Es stellt sich allerdings die Frage, auf welche Weise sie dies tun.

Während ihres Transports im Blutstrom sind die Tumorzellen ständigen Widrigkeiten wie dem Immunsystem oder mechanischen Scherkräften ausgesetzt.⁴⁹⁻⁵¹, wogegen Thrombozyten Schutz bieten könnten. Jedoch konnte in Versuchen gezeigt werden, dass Tumorzellen oftmals den Weg durch die Gefäße allein bestreiten, und so letztendlich als Einzelzelle in einem Organ stecken bleiben.⁵²⁻⁵⁴ Innerhalb der ersten Minuten danach allerdings bilden sich die Thrombozyten-Tumorzell-Verbindungen aus. Diese führen über die Aggregation der Thrombozyten zur Thrombusbildung um die Tumorzelle herum und damit zu einer Stabilisierung ihrer Anheftung ans Endothel.^{53, 55} Das heißt: Die Thrombozyten üben ihren Einfluss hauptsächlich an der schon adhärennten Tumorzelle aus und sind dabei direkt an der Ausbildung einer metastatischen Nische beteiligt. In diesem Zusammenhang wird den Thrombozyten eine Reihe von Funktionen zugeschrieben. Neben der erwähnten Stabilisierung der Tumorzellen können sie diese durch Sekretion von Wachstumsfaktoren zur Proliferation anregen.⁵⁶ Zusätzlich können die Thrombozyten die weitere Invasion in das Organ über die Sekretion von EZM degradierenden Enzymen unterstützen.⁵⁷

Im zeitlichen Verlauf beginnt der Thrombus sich ungefähr zwei Stunden, nachdem sich die Thrombozyten um die Tumorzelle formiert haben, wieder aufzulösen und nach circa 24 Stunden ist er verschwunden.^{53, 54} Sämtliche beschriebenen Effekte finden also in den ersten Stunden nach der Adhäsion der Tumorzelle an der Endothelwand und somit genau in der Phase des Aufbaus einer metastatischen Nische statt.

1.3.4 HPCs und die Prämetastatische Nische

Bei den bisherigen Überlegungen wurde stets davon ausgegangen, dass die Tumorzelle nach dem Transport im Blut auf ein unvorbereitetes Endothel trifft und dort versucht, sich eine Nische zu bilden. Neuere Untersuchungen haben allerdings das Konzept einer prämetastatischen Nische entworfen, einer Nische also, die sich schon vor Ankunft der Tumorzelle ausbildet. Dafür werden Faktoren des Tumors und die Wirkung von begleitenden Zellen verantwortlich gemacht. Ein Primärtumor führt durch die Ausschüttung von Mediatoren, vornehmlich VEGF-A, PlGF, Tgf- β und Tnf α ^{58, 59}, zur

Mobilisation von HPCs in die Blutbahn. Diese besitzen den VEGF-Rezeptor 1 und können somit insbesondere VEGF-A und PlGF erkennen. Zugleich sollen die sezernierten Mediatoren im Lungengewebe für eine stärkere Expression und damit lokale Ansammlung von Fibronectin, sowie für eine vermehrte Produktion eines Matrix und Basalmembran degradierenden Enzyms, der MMP9, sorgen.^{18, 60} Die im Blutstrom befindlichen HPCs können über das exprimierte Integrin $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) an Fibronectin binden und sich folglich in der Lunge anlagern.¹⁸ Zusammen mit den Stromazellen der Lunge und den Endothelzellen bilden die HPCs dann eine Nische, die durch die Sekretion von Chemokinen und MMPs, sowie durch die Expression von Adhäsionsmolekülen einen geeigneten Ort zur Anheftung und zum Überleben einer ankommenden Tumorzelle darstellt.

Ein interessanter Aspekt der Versuche ist, dass es allein durch die intraperitoneale Gabe eines Mediums, das aus der Zellkultur von Tumorzellen gewonnen wird, aber die Zellen selber nicht beinhaltet, zu den beschriebenen prämetastatischen Nischen mit lokaler Fibronectinansammlung und HPCs kommt.⁵⁸ Daraus ergibt sich natürlich die Frage, welche von den Tumorzellen sekretierten Faktoren in dem Medium enthalten sind, die für diese Effekte sorgen können. Bei der Analyse fällt insbesondere ein konstant hoher Wert an VEGF-A und eine variable Menge an PlGF auf.⁵⁸ In ihrer Zusammensetzung sind sie vermutlich maßgeblich an der Nischenbildung beteiligt, doch die genauen Mechanismen bleiben dabei unklar. Beide von den Tumorzellen produzierten Wachstumsfaktoren sind Liganden des VEGFR1 und können so auf die HPCs Einfluss nehmen. Wie aber die Stimulation zu mehr Fibronectinexpression in den Fibroblasten des Lungengewebes erfolgen soll, bleibt offen. Ebenso welche weiteren Auswirkungen eine VEGF-A-Sekretion der Tumorzellen auf die metastatische Nische hat.

Eine andere Frage ist, wie die HPCs das vermehrte Fibronectin erkennen können. Zwar besitzen diese einen Rezeptor für Fibronectin, aber Fibronectin befindet sich normalerweise in der EZM und damit für die HPCs hinter der Endothelschicht verborgen. Möglicherweise kommt statt dem Fibronectin in der EZM eher dem plasmatischen Fibronectin eine große Bedeutung zu. Dieses wäre sowohl für die HPCs, als auch für die ankommende Tumorzelle direkt zur Verfügung. Damit stellt sich die Frage, ob plasmatische Fibronectin Einfluss auf die Tumorzellansiedlung hat.

Es bleiben also zwei Faktoren offen, deren Einfluss auf die Bildung einer metastatischen Nische – unabhängig, ob vor oder nach dem Eintreffen der Tumorzelle – noch weiterer Klärung bedarf: zum einen der Wachstumsfaktor VEGF-A, zum anderen das Glykoprotein Fibronectin. Dementsprechend sollen diese in den nächsten beiden Abschnitten noch eingehender betrachtet werden, um dann über die Herausarbeitung noch unzureichend geklärter Punkte auf den experimentellen Teil dieser Arbeit überzuleiten.

1.3.5 VEGF-A

Der Wachstumsfaktor VEGF-A ist ein Glykoprotein, das vor allem von Endothelzellen, aber auch von einer Reihe weiterer Zellen produziert werden kann, und mit PlGF, VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D zu einer gemeinsamen Genfamilie gehört.⁶¹⁻⁶³ Er gilt als ein entscheidender Faktor für das Wachstum, die Proliferation und das Überleben von Endothelzellen, sowie für die Angiogenese in physiologischen, als auch in pathologischen Situationen.^{62, 64-68} Die Expression von VEGF-A ist in erster Linie sauerstoffabhängig über Hif-1 (hypoxia inducable factor) reguliert;⁶⁹⁻⁷¹ doch auch durch andere Cytokine, wie zum Beispiel Tgf- β ^{72, 73} oder aktivierte Onkogene kommt es zur vermehrten Synthese.^{74, 75} VEGF-A bindet an zwei verschiedene Rezeptoren: VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR1/ Flt-1) und VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2/ Flk-1), wobei die Bindungsaffinität zu VEGFR1 wesentlich höher ist als zu VEGFR2.⁷⁶ Dennoch wird VEGFR2 als der Haupteffektor von VEGF-A für Angiogenese und die Effekte auf das Endothel verstanden,^{66, 77-79} da eine Bindung von VEGF-A an VEGFR1 im Vergleich nur zu einer sehr geringen Tyrosinkinase-Aktivität in den entsprechenden Zellen führt.⁸⁰ Die genaue Funktion von VEGFR1 erscheint daher größtenteils noch unklar.⁶² Allerdings ist ein Knockout bezüglich VEGFR1 bei Tieren letal, was auf eine wichtige Rolle zumindest in der Entwicklung hindeutet.⁸¹ Vermutet wird, dass VEGFR1 als eine Art Falle agiert, indem VEGF-A ohne Aktivität gebunden und so von VEGFR2 fern gehalten wird.^{82, 83} Unterstützt wird diese Vorstellung durch Untersuchungen zu PlGF. PlGF ist homolog zu VEGF-A aufgebaut, bindet allerdings exklusiv an VEGFR1. Dort kann es möglicherweise gebundenes VEGF-A verdrängen und so für eine Bindung an VEGFR2 bereitstellen, weshalb sich durch PlGF die Wirkung von VEGF-A über VEGFR2 verstärkt.^{68, 82} Daneben existieren aber für PlGF auch noch andere Wege, auf

denen es direkter, zum Beispiel auf das Wachstum und Überleben von Endothelzellen, einwirken kann.^{67, 84}

In vielen Tumorarten ist die Produktion von VEGF-A hochreguliert, was mit verbessertem Wachstum und Überleben der Tumorzellen, Angiogenese und damit insgesamt mit einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden ist.^{63, 79, 85-91} Vor allem der Aspekt der Angiogenese führte zu einer Reihe von Versuchen, das Überleben von Tumorpatienten mit einer gegen VEGF-A gerichteten Therapie zu verbessern.⁶¹ Dabei zeigen unter anderem monoklonale Antikörper gegen VEGF-A durchaus Erfolge im Gesamtüberleben der Patienten.⁹² Das genaue Wirkprinzip der Therapie jedoch ist dabei nicht vollständig verstanden,⁹³ da ein Ansprechen auf die Medikation nicht ausschließlich auf eine Reduzierung der versorgenden Gefäße zurückzuführen ist.⁹⁴ Die Angriffspunkte einer Anti-VEGF-A-Therapie werden von daher auf mehreren Ebenen, von der Stabilisierung des Gefäßsystems im Primärtumor,^{95, 96} bis zur Modulation der Immunantwort,^{97, 98} diskutiert. Aber auch bei der Bildung einer metastatischen Nische – und das ist entscheidend für diese Arbeit – kann von den Tumorzellen produziertes VEGF-A möglicherweise eine wichtige Rolle spielen und damit eine gegen VEGF-A gerichtete Therapie wirksam sein. Neben der schon erwähnten Mobilisierung von VEGFR1⁺-HPCs⁵⁸ kommt VEGF-A eventuell auch bei der Überwindung der Endothelbarriere eine große Bedeutung zu. Ursprünglich wurde VEGF-A im Zusammenhang mit der Bildung von malignem Aszites als Vascular Permeability Factor (VPF) beschrieben. Dieser Faktor konnte die Gefäße für Blutplasma durchlässiger machen und so für eine Ansammlung von Aszites sorgen.⁹⁹ Inzwischen weiß man, dass VEGF-A dazu in der Lage ist, Endothelzellverbindungen zu lösen und so regelrechte Lücken in der Endothelwand zu schaffen.^{89, 100-102} In diesen Lücken wird die dahinter liegende Basalmembran freigelegt, was einer wandernden Tumorzelle wiederum eine sehr gute Möglichkeit zur Adhäsion und Extravasation bieten könnte.¹⁰³ Die Frage ist also, ob VEGF-A im Verlauf der Metastasierung neben der Angiogenese, nicht auch schon an vorangehenden Schritten wie der Extravasation der Tumorzellen ganz maßgeblich beteiligt ist. Die Antwort darauf, wie sich also VEGF-A vor Ort auf die Nischenbildung tatsächlich auswirkt, ist bisher nicht bekannt.

Neben VEGF-A wird in Zusammenhang mit der metastatischen Nische vor allem dem Fibronectin eine große Bedeutung zugemessen. Im Folgenden soll es um dessen Rolle bei der Ansiedlung von Metastasen gehen.

1.3.6 Fibronectin

Mit einem Molekulargewicht von circa 500 kDa ist Fibronectin ein relativ großes Glykoprotein, das beim Menschen in zwei grundsätzlich verschiedenen Konformationen vorkommt: Einerseits als fester Bestandteil der EZM (zelluläres Fibronectin / cFn), andererseits als löslicher Faktor im Blutplasma (plasmatisches Fibronectin / pFn).¹⁰⁴ Zelluläres Fibronectin wird in erster Linie von Fibroblasten gebildet und in die Zellzwischenräume abgegeben, wo es sich dann zu Fibrillen sortiert und eine Matrix ausbildet.¹⁰⁵ Plasmatisches Fibronectin hingegen wird ausschließlich von Hepatozyten produziert und in einer Konzentration von 300 – 400 µg/ml ins Plasma sezerniert.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Die Struktur des Fibronectin-Moleküls ist ein Dimer, das aus zwei ähnlichen bis identischen Untereinheiten besteht,^{109, 110} wobei jede dieser Untereinheiten sich durch die Aneinanderreihung einer Kombination aus drei homologen Domänen zusammensetzt.¹¹¹ Obwohl für Fibronectin nur ein einziges Gen existiert, können so durch alternatives Splicen und posttranslationale Modifikation an den Domänen beim Menschen bis zu 20 verschiedene Varianten von Fibronectin entstehen.¹¹²

Fibronectin hat eine Reihe verschiedener Bindungsstellen, unter anderem für viele Bestandteile der EZM wie Kollagene, aber auch für Faktoren des Blutplasmas wie Fibrin, Heparin und wichtiger Weise auch andere Fibronectinmoleküle.^{104, 112-116} Die Bindung an Zellen erfolgt über Integrine, die eine bestimmte Abfolge an Aminosäuren im Fibronectinmolekül, die so genannte RGD-Sequenz, erkennen können.¹¹⁷ Integrine bestehen stets aus einer alpha(α)- und einer beta(β)-Untereinheit und stellen für Zellen die Hauptgruppe der Zelladhäsionsrezeptoren für Bestandteile der EZM dar.¹¹⁸ Fibronectin kann von mehreren Integrinen gebunden werden, wobei als der klassische Rezeptor, der die RGD-Sequenz erkennt und auch die intrazellulären Effekte vermittelt, das Integrin-α5β1 gilt.^{104, 109, 119-121} Physiologischerweise scheint die Verbindung von Fibronectin mit dem Integrin-α5β1 insbesondere bei der Angiogenese als ein Proliferations- und Ausreifungssignal für Endothelzellen von Bedeutung zu sein.¹²¹⁻¹²⁴

Verdeutlicht wird das durch letale Defekte im Gefäßsystem von Fibronectin^{-/-}-Knockout-Mäusen.¹²⁵

Für diese Arbeit entscheidend ist die Frage, was für eine Rolle Fibronectin im Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung, insbesondere beim Vorgang der Metastasierung, spielt. Dabei können erneut die verschiedenen Formen des Fibronectins differenziert werden. Zunächst zum cFn: Neben den Fibroblasten sind auch Tumorzellen selbst in der Lage, cFn zu produzieren und ins umliegende Gewebe abzugeben. Da cFn ein strukturbildendes Protein für die EZM darstellt, würde man davon ausgehen, dass eine erhöhte Sekretion von cFn einer Invasion ins Gewebe und somit einer nachfolgenden Metastasierung eher hinderlich wäre.^{118, 126} Dennoch findet sich insbesondere bei invasiven Karzinomen eine erhöhte Expression von cFn, was zudem eine pro-metastatische Auswirkung zu haben scheint.¹²⁷⁻¹³⁰ Gründe dafür könnten sein, dass cFn über die Bindung an Integrin- $\alpha 5 \beta 1$ ein Überlebenssignal vermitteln kann und zudem ein intaktes extrazelluläres Fibronectin essentiell für die Proliferation von Tumorzellen zu sein scheint.¹³¹⁻¹³³

Bei der Ausbildung einer metastatischen Nische spielt aber möglicherweise das pFn eine entscheidende Rolle. Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, scheint eine wichtige Voraussetzung für eine Nischenbildung die feste Adhäsion der Tumorzelle am Endothel oder an darunter liegenden Schichten zu sein. Mit seinen verschiedenen Bindungsstellen wäre pFn als eine Art Verbindungsstück gut denkbar. Zwar liegt pFn im Plasma normalerweise in einer gefalteten, „inaktiven“ Struktur vor, doch durch mechanische Kräfte sowie durch die Bindung an Zellrezeptoren kann pFn entfaltet und in der Folge alle Bindungsstellen frei gelegt werden.^{113, 134-136} Melanomzellen zum Beispiel sind in der Lage, pFn zu binden und so eine Funktion des pFn bei der Bildung einer Nische zu ermöglichen.¹³⁷

Es existiert eine Reihe von Versuchen, die die These einer wichtigen Rolle des pFn bei der Metastasenansiedlung weiter untermauern. So wurde in Experimenten versucht, die Funktion des pFn durch die Gabe von RGD-Peptiden – also Peptiden, die die Zellbindungssequenz des pFn enthalten – kompetitiv zu hemmen. Tatsächlich reduziert sich die Anzahl der Metastasen unter solch einer Behandlung signifikant.¹³⁸⁻¹⁴¹ In Studien konnte zudem gezeigt werden, dass durch die vermeintlich fehlende Wirkung

des pFn schon in den ersten Stunden nach intravenöser Injektion der Tumorzellen weniger von diesen in der Lunge verbleiben konnten,¹⁴² was im Umkehrschluss auf eine Rolle des pFn bei der Anheftung der Tumorzellen ans Endothel hindeutet. Andere Untersuchungen sehen als Haupteffekt durch die RGD-Peptide eher eine verminderte Invasion durch die Basalmembran,¹⁴³ doch die Auswirkung auf den Gesamtvorgang der Nischenbildung wird deutlich. Allerdings kann man an Hand dieser Modellversuche noch keine definitive Aussage über pFn machen, denn die verwendeten RGD-Peptide können von vielen Integrinen erkannt werden und stellen somit keine spezifische Konkurrenz des pFn dar.¹¹⁸

Daher wurden Versuchsmäusen mit Tumoren zum Zweck einer Hemmung des normalen Fibronectins intraperitoneal entweder Fibronectinfragmente oder künstlich induzierte polymere Fibronectinmoleküle gegeben, wodurch sich ebenfalls die Zahl der Metastasen reduzieren ließ.^{144, 145} Doch auch dieses Modell ist nur eingeschränkt aussagekräftig, da die genauen Auswirkungen einer intraperitonealen Gabe des künstlichen Fibronectinproduktes nicht bekannt sind. Natürlich ist eine Verdrängung der normalen Besetzung mit pFn an den Tumorzellen zu erwarten, aber was für weitere, ungeplante Wechselwirkungen entstehen, ist nicht vorherzusagen. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von pFn entstammt Versuchen, die eine verstärkte Bindung von Tumorzellen an diejenigen Endothelien zeigen konnten, die das Transmembranprotein Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV) besitzen.^{146, 147} Die Anheftung an DPP-IV, auch bekannt als „fibronectin-binding protein“, kann über pFn vermittelt werden, das in seiner normalen Konformation verborgene Bindungsstellen für DPP-IV besitzt.^{136, 148} Das vorgeschlagene Modell sieht folgendermaßen aus: Eine Tumorzelle, die in das Gefäßsystem gelangt, wird in der Folge von einem Fibronectinmantel umgeben, der zunächst von endogenem, tumorzeleigenem Fibronectin auf der Oberfläche induziert und dann durch sich anbindendes pFn sukzessiv vergrößert wird. Durch die Anheftung verändert pFn seine Konformation und die Bindungsstellen für die DPP-IV werden frei, was eine feste Adhäsion der Tumorzelle an den DPP-IV exprimierenden Endothelien mit Hilfe der Fibronectin-Ummantelung ermöglicht.¹³⁰ In diesem Ablauf würde dem pFn eine entscheidende Rolle bei der Ansiedlung der Tumorzellen zukommen, doch welchen Stellenwert das pFn tatsächlich besitzt, insbesondere im Verhältnis zum endogenen Fibronectin, ist nicht geklärt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch eine Reihe von Versuchen Hinweise auf eine Beteiligung des pFn an der Tumorzelladhäsion und damit der Bildung einer metastatischen Nische geliefert worden sind. Allerdings weisen die verwendeten Modelle viele potentielle Fehlerquellen auf, so dass bisher keine sichere Aussage über pFn getroffen werden konnte.

1.4 Fragestellung

Basierend auf dem Konzept einer metastatischen Nische wird heute über eine Vielzahl von Faktoren diskutiert, die an der Ansiedlung von Tumorzellen in einem fremden Organ beteiligt sein sollen. Zwei davon, die in letzter Zeit insbesondere mit der Ausbildung einer prämetastatischen Nische in Verbindung gebracht wurden, sind VEGF-A und Fibronectin.

Von Tumorzellen produziertes VEGF-A scheint zusammen mit PlGF Nischen-mitbildende Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mobilisieren zu können, während Fibronectin als Adhäsionsfaktor für die ankommenden Zellen dient. Das würde bedeuten, dass die VEGF-A-Sekretion neben der später ablaufenden Angiogenese auch schon vor der Loslösung der Tumorzellen vom Primärtumor an der Metastasenbildung beteiligt ist. Noch unklar dagegen ist, ob sie zusätzlich auch eine Rolle in der Phase dazwischen spielt, während sich die Tumorzelle im Blutgefäß befindet. Genau dieser Zeitraum ist insofern von großer Relevanz, da er dem Intervall entspricht, in dem die Tumorzelle am besten medikamentös erreicht werden kann. Deswegen soll sich der erste Teil der Arbeit mit der Frage befassen:

(1) Welche Rolle spielt die VEGF-A-Sekretion der Tumorzellen beim Vorgang der hämatogenen Metastasierung?

Von Fibronectin ist bekannt, dass es eine Vielzahl von Bindungsstellen für Bestandteile der EZM, aber auch für Oberflächenmoleküle von Zellen hat. Insofern liegt der Verdacht nahe, dass Fibronectin an der Adhäsion von wandernden Tumorzellen beteiligt sein könnte. Da für die Tumorzelle im Blutgefäß cFn zunächst hinter einer intakten Endothelwand verborgen bleibt und gleichzeitig pFn in hoher Konzentration verfügbar ist, wird sich die Untersuchung der initialen Ansiedlung von Tumorzellen

sinnvollerweise mit der plasmatischen Variante des Fibronectin beschäftigen. Die Fragestellung für den zweiten Teil dieser Arbeit lautet:

(2) Hat das Vorhandensein von pFn Auswirkung auf das Überleben einer Tumorzelle im Blutgefäß?

Aus dem vorher Genannten ergeben sich also zwei zentrale Fragen, die durch diese Arbeit mit denen im nächsten Kapitel beschriebenen Methoden beantwortet werden sollen.

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zu Metastasierungsvorgängen in-vivo, das heißt in diesem Fall an der lebenden Maus durchgeführt. Durch gezielte Einflussnahme auf relevante Faktoren wird versucht, das Metastasierungsverhalten nach Tumorzellinjektion zu beeinflussen. Um auftretende Effekte auch erkennen zu können, gibt es eine Vielzahl an Untersuchungsmöglichkeiten. Dabei kommt in dieser Arbeit vom bloßen makroskopischen Betrachten und Auszählen der Metastasen, über histochemische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung, bis zur molekularbiologischen Genexpressionsanalyse eine Reihe von Techniken zur Anwendung, die im Folgenden genauer erläutert werden sollen.

2.1 Versuchsablauf zur Metastasierung in-vivo

2.1.1 Tumorzellen

2.1.1.1 Zellkultur

Als Tumorzellen wurden murine Melanomzellen mit der Bezeichnung B16 D5 verwendet. Die Kultur der Zellen erfolgte in RPMI 1640, dem 1mM Na-Pyruvat, 2mM Glutamin, 50mM 2-Mercaptoethanol und 10 % fetalem Kälberserum (FKS) zugesetzt wurde. Um mit den Zellen in der möglichst gleichen Entwicklungsstufe zu arbeiten, wurden die Tumorzellen in mehreren Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für jeden Versuch wird eine Portion entnommen, kultiviert und bis zur Verwendung maximal viermal gesplittet.

2.1.1.2 Transfektion mit siRNA

Durch die Transfektion mit siRNA soll die Produktion eines bestimmten Proteins in den Tumorzellen auf ein Minimum reduziert werden. Dafür wurde mit Hilfe des Programms „Block-iT RNAi Designer“, das online von der Firma „invitrogen“ angeboten wird, unter Angabe des gesuchten Genproduktes ein mögliches molekulares Design für eine hemmende siRNA erstellt. Die passende siRNA wurde dann von der Firma „invitrogen“ hergestellt und in lyophilisiertem Zustand geliefert. Die weitere Zubereitung erfolgte

nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll. Die Transfektion selber wurde mit Lipofectamine 2000 nach Herstellerprotokoll durchgeführt. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen verwendet.

2.1.1.3 Charakterisierung der Tumorzellen (Genexpressionsarray)

Die Charakterisierung der verwendeten Tumorzellen in Bezug auf alle exprimierten Gene wurde am Institut für Tumorbilogie der Medizinischen Klinik II in Köln durch Frau Dr. S. Debey-Pascher gemacht. Hierzu erfolgte zunächst die RNA-Isolierung aus Tumorzelllysat (siehe 2.7.2), anschließend wurde die Synthese der cDNA und die Hybridisierung mit Hilfe des Kits „Sentry Mouse-6 Expressions Beadchip“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.1.2 Versuchstiere

Zur Durchführung der meisten in-vivo-Versuche werden circa zehn bis zwölf Wochen alte C57/Bl6-Mäuse verwendet. Für die besondere Fragestellung zur Rolle des pFn allerdings, wurden konditionelle Plasmafibronectin-K.o.-Mäuse vom Stamm FN H/H eingesetzt, die wir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um R. Fässler vom MPI Martinsried erhalten hatten und deren Hintergrund und Erscheinungsbild bereits beschrieben ist.¹⁴⁹ Nach Isolierung von DNA aus einem Schwanzstück wurden alle Versuchstiere mit Hilfe von geeigneten Primern durch PCR-Analyse auf das Vorhandensein von „Mx-Cre“, der für den konditionellen Knockout notwendigen Rekombinase, getestet. Vom Ergebnis abhängig konnten die Mäuse der Versuchs- und der Kontrollgruppe zugeordnet werden. Anschließend wurden die Tiere beider Gruppen dreimalig mit einer intraperitonealen Gabe von 250 µg poly(dI-dC) im Abstand von 3 Tagen behandelt, was zu einem kompletten Verschwinden des Plasmafibronectins aber nur in der Knockoutgruppe mit „Mx-Cre“ führte. Dies konnte durch Western Blot Analyse gezeigt werden. Um einen eventuellen, unerwünschten Einfluss des poly(dI-dC) auf den Versuchsverlauf zu minimieren, erfolgte nach der letztmaligen Gabe eine zweiwöchige Pause bevor mit den Versuchen begonnen wurde.

2.1.3 Versuchsdurchführung

Im Standard-Versuchsablauf wurden den Mäusen $2 \cdot 10^5$ D5-Tumorzellen, in einem Volumen von 100 µl PBS gelöst, in eine laterale Schwanzvene injiziert. Dabei wurde

ein Verfahren verwendet, bei dem ein Katheter in die Vene eingeführt wurde, dessen korrekte Lage durch Spülung mit PBS überprüft werden konnte. So konnte mit größtmöglicher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Tumorzellen den venösen Blutstrom unmittelbar ohne Umwege erreichen. Nach einem vorher definierten Zeitraum wurde dann unter Narkose (ca. 150 µl Rompun/Ketavet/PBS 1:1:1 i.p.) der Thorax eröffnet und die beiden Lungenflügel sowie weitere Organe entnommen. In der Regel wurde die linke Lunge zur Fixierung in ein Gefäß mit PAH gegeben, für mindestens 36 h bei +4° C gelagert und nach Umbettung in TissueTek bei -80° C aufbewahrt. Zusätzlich wurden die PAH-Lungen vor dem Einfrieren noch für die makroskopische Auswertung von Ober- und Unterseite fotografiert. Die rechte Lunge wurde zur einen Hälfte in ein mit RNAlater gefülltes Gefäß gegeben, dann für mindestens 36 h bei +4° C gekühlt und anschließend bei -20° C eingefroren. Die andere Hälfte wurde für eine spätere Proteinanalytik unmittelbar nach Entnahme aus dem Körper in Trockeneis gefroren und langfristig bei -80° C verwahrt. Andere Organe, die zusätzlich entnommen wurden, wurden auf die gleiche Weise wie die Lunge behandelt. Die Blutentnahme erfolgte durch eine transdiaphragmale Herzpunktion beim noch lebenden Tier. Dazu wurde in einer 1ml-Spritze ein Volumen von 150 µl Natriumcitrat vorgelegt und nach erfolgter Punktion circa 400 µl Blut entnommen. Die Erythrozyten in den Blutproben wurden für fünf Minuten bei 11000 g ab zentrifugiert, wodurch anschließend das Blutplasma ab pipettiert werden kann. Die Blutplasmen wurden bei -80° C aufbewahrt.

2.2 Makroskopische Auswertung

Der erste Schritt der Auswertung bei den Mausversuchen bestand darin, die Lungenflügel zu betrachten und die oberflächlich sichtbaren Metastasen auszuzählen. Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass es erstens innerhalb der Versuchsmäuse Differenzen in der Größe der Lungenflügel gibt, wodurch die Anzahl der sichtbaren Metastasen beeinflusst wird, und zweitens der Durchmesser der einzelnen Metastasen sehr unterschiedlich ist, wurde zusätzlich zum Auszählen der Metastasen eine Flächenauswertung vorgenommen. Hierbei wurde an einer digitalen Fotografie des Lungenflügels mit Hilfe eines Computerprogramms (ImageJ) zunächst die Gesamtfläche aller Metastasen bestimmt, anschließend die Oberfläche des ganzen

Lungenflügels. Aus diesen beiden Werten wurde ein Quotient gebildet, der das Verhältnis von Gesamt-Metastasenoberfläche zu Lungenoberfläche wiedergibt.

2.3 Mikroskopische Auswertung

Für eine genaue Betrachtung der direkten Umgebung einer Metastase im Lungengewebe wurden fluoreszenzmikroskopische Techniken angewandt. Dazu wurden zunächst von den tiefgekühlten Lungen mit Hilfe des Kryostat 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf ein Objektträgerglas aufgetragen. Vor einer Weiterbehandlung erfolgte dann eine mindestens zwölf Stunden lange Pause, damit die Gewebeschnitte am Objektträger antrocknen konnten.

Die Anfärbung begann mit einem 20-minütigem Kochen des Objektträgers in der Tris/EDTA-Lösung zum sogenannten Antigen Retrieval. Die Tris/EDTA-Lösung setzte sich wie folgt zusammen: 6,055 g Tris(121,1 mol/l) und 0,372 g EDTA(372,24 mol/l) wurden mit circa 800ml DMDC-Wasser gut vermischt. Dann wurde durch entsprechende Zugabe von Salzsäure beziehungsweise Natronlauge der pH-Wert der Lösung auf 9 eingestellt. Abschließend wurde mit DMDC-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 1 Liter aufgefüllt. Damit ergab sich die fertige Tris/EDTA-Lösung mit den gewünschten Konzentrationen von 50 mM Tris und 1 mM EDTA.

Nach 20 Minuten Abkühlen in der Lösung und anschließenden dreimal zweiminütigen Waschvorgängen in destilliertem Wasser, wurde der Objektträger für die Inkubation feucht in einem Shandon-Coverplate eingespannt. Als erstes wurden je 2ml PBS + 0,1 % Triton auf die Coverplates aufgetragen, was nach 10 Minuten Inkubationszeit durch Nachspülen mit 2ml PBS wieder entfernt wurde. Danach erfolgte das sogenannte Blocken zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der 1.Antikörper. War dieser 1.Antikörper von der Maus, wurden zum Blocken 150µl aus einem Gemisch aus einem Tropfen Mouse-over-Mouse-Blocker und 1250µl PBS verwendet. Stammte der 1.Antikörper von einem anderen Tier, wurden stattdessen drei Tropfen ImageIT-Blocker angewandt. In beiden Fällen erfolgte die Zugabe des 1.Antikörper nach 30 min Inkubation mit den genannten Substanzen.

1. Antikörper			2. Antikörper	
Name	Quelle	Verdünnung	Name	Verdünnung
α -Fibronectin	Rabbit	1:400	Alexa 488 α -Rabbit	1:400
α -VEGF	Goat	1:50	Alexa 488 α -Goat	1:200
α -Melanoma	Mouse	---	Alexa 546 α -Mouse	1:200

Tab. 2-1 Für die Histochemie verwendete Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen

Alle Antikörper wurden in einer PBS-Lösung mit 5% donkey-serum und 0,025% Tween entsprechend ihres spezifischen Verhältnisses verdünnt (Tab. 2-1). Eine Ausnahme bildete der α -Melanoma-Antikörper, der schon vom Hersteller in einer getesteten Verdünnung geliefert wurde. Von dem Gemisch wurden jeweils 150 μ l auf den Objektträger gegeben. Die Inkubation mit dem 1.Antikörper erfolgte dabei über Nacht bei 4°C, die des 2.Antikörpers für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach beiden Inkubationen wurden die Objektträger jeweils mit 2ml PBS gewaschen. Anschließend wurde zusätzlich noch eine Kernfärbung durch fünfminütiges Einwirken von 150 μ l Hoechst 33342/PBS (1:400) auf die Gewebeschnitte erreicht.

Eine Besonderheit stellte die Markierung von Tumorzellen vor der Injektion in die Versuchstiere dar. Diese mussten in den späteren Schnitten nicht extra angefärbt werden, sondern waren selbstfluoreszierend. Die Markierung der Tumorzellen erfolgte mit CellTracker Red CMPTX und wurde streng nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt.

Zum Schluss wurden die Objektträger aus den Coverplates genommen, durch Eintauchen in PBS erneut gewaschen und die Gewebeschnitte durch das Auftragen von Deckgläsern mit Antifading Mounting Medium vor äußeren Einflüssen geschützt. Um die Deckgläser antrocknen zu lassen wurde für mindestens 10 Stunden gewartet, bevor die Gewebeschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit Hilfe von Computersoftware ausgewertet wurden.

2.4 Western Blot

Zusammensetzung der im WB verwendeten Puffer
Tris-Hepes-Puffer: 60,5 g Tris, 119,0 g Hepes und 5,0 g SDS
Anodenpuffer I (pH 10,4): 18,15 g Tris und 100 ml Methanol
Anodenpuffer II (pH 10,4): 1,52 g Tris und 100 ml Methanol
Kathodenpuffer (pH 7,6): 2,6 g Aminohexansäure und 100 ml Methanol
Zutaten jeweils mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500ml auffüllen und gut vermischen.

Tab. 2-2

Zum spezifischen Nachweis eines Proteins in einem Gewebe oder dem Blutplasma wurde das Verfahren des Western Blots verwendet. Hierzu wurde zunächst die Probe verdünnt. (Beim Plasma: 1:25 mit PBS, dann das Gemisch noch einmal 1:10 mit dem Loading-Puffer). Von dieser Verdünnung wurden jeweils 10µl für die weiteren Schritte benötigt. Als erstes wurde die Probe zur Protein-Denaturierung fünf Minuten im Wasserbad gekocht und danach für fünf Minuten bei 4° C und 13200 rpm zentrifugiert. Als nächstes wurden die abzentrifugierten Proteine durch Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dafür wurde ein Polyacrylamid-Gel (10%) in die mit Tris-Hepes-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt, und die Probe sowie 6µl eines Markers (Page Ruler) jeweils in eine Tasche des Gels pipettiert. Bei einer Laufzeit von circa zwei Stunden bei 25 mA wurde eine ausreichende Verteilung der Proteine nach Molekulargewicht auf dem Gel erreicht.

Die aufgetrennten Proteine konnten nun mit Hilfe des Western Blots spezifisch nachgewiesen werden. Es wurden hierfür die folgenden Schritte durchgeführt:

- (1) Der Transfer der Proteine auf Nitrozellulose mit Hilfe des semi-dry Blotting. Dazu wurden die Nitrocellulose in destilliertem Wasser und die Filterpapiere in den Puffern eingeweicht. Dann werden auf den Blotting-Apparat der Reihe nach von unten nach oben gelegt: sechs Filterpapiere mit Anoden-Puffer I, drei mit Anodenpuffer II, die Nitrozellulose, das Gel mit den Proteinen und neun

Filterpapiere mit dem Kathodenpuffer. Anschließend wurde der Transfer für 1,5 Stunden bei 55mA ($0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel) durchgeführt.

- (2) Blockade einer unspezifischen Bindung durch Inkubation der Nitrozellulose mit 25 ml Blocker-Lösung (5 g Blotting-Grade-Blocker-Pulver in 100 ml PBS + 0,1% Tween) für eine Stunde unter ständiger Bewegung. Anschließend erfolgten drei fünfminütige Waschwgänge.
- (3) Inkubation mit dem 1.Antikörper. Der 1.Antikörper wurde in seinem spezifischen Verhältnis (Rb-x-Ms Fibronectin: 1:2000) mit 10ml Lösung (0,5 g Albumin bovine serum mit PBS + 0,1 %Tween auf 10ml bringen) vermischt und danach zur Bindung an die gesuchten Proteine auf die Nitrozellulose gegeben. Nach Inkubation über Nacht erfolgten erneut drei Waschwgänge mit PBS.
- (4) Inkubation mit dem 2.Antikörper. Hierzu wurde ein mit Peroxidase konjugierter Antikörper (Anti-Rabbit IgG; 1:40000 verdünnt in 10 ml Blocking-Puffer) für eine Stunde auf die Nitrozellulose gegeben. Anschließend wurden drei Waschwgänge mit PBS durchgeführt.
- (5) Detektion der gebundenen Antikörper mit Hilfe des West-Femto-Kit. Dazu wurden 2 ml des Kit (1:1 mit NaCl 0,9% gemischt) auf die Nitrozellulose gegeben. Durch Reaktion mit der an die 2.Antikörper konjugierte Peroxidase kam es zur Ausstrahlung sichtbaren Lichts.
- (6) Auswertung der Lichtintensität in der Dunkelkammer mit Hilfe einer Digitalkamera (Orca-ER) und geeigneter Computersoftware (Wasabi Imaging Software).

2.5 ELISA

Die Methode des ELISA dient ebenfalls zur Messung spezifischer Proteine in Lösungen. In dieser Arbeit wurden die beiden Glykoproteine VEGF-A und PlGF bestimmt. Hierzu kamen die ELISA-Kits „Quantikine Mouse VEGF/PlGF-2“ von R&D Systems nach vorgeschriebenem Protokoll zur Anwendung. Die photometrische Auswertung erfolgt an dem Gerät „Easy Reader EAR 400 AT“.

2.6 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (auch FACS genannt) wird dazu benutzt, Zellen auf das Vorhandensein bestimmter Oberflächeneigenschaften zu testen. Im Konkreten wurden in dieser Arbeit die im Tiermodell verwendeten D5-Tumorzellen auf eine Oberflächenbindung von Fibronectin untersucht. Dafür wurden $2 \cdot 10^5$ Tumorzellen in PBS suspendiert, in ein BD Falcon Tube gegeben und die Suspensionsflüssigkeit anschließend wieder abgeschüttet. Im nächsten Schritt wurden 5µl des Anti-Fibronectin-Polyclonal-Antibody zur Markierung eventuell vorhandenen Fibronectins hinzugegeben, für 30 Minuten bei 4° C inkubiert und anschließend mit PBS abgewaschen. Als 2. Antikörper wurden 5µl Alexa 488 anti-rabbit (fluoreszierender Antikörper) verwendet, die ebenfalls für 30 Minuten bei 4° C zu den Tumorzellen gegeben wurden. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das Zellpellet in circa 300 µl PBS suspendiert und die Messung mit dem Gerät FACSort der Firma Becton Dickinson durchgeführt.

2.7 Molekularbiologische Auswertung

Einen guten Eindruck davon, was für Vorgänge sich in einer Zelle abspielen, liefert die Gesamtheit der mRNA. Sie gibt Aufschluss darüber, welche Gene in der Zelle aktuell abgelesen werden. Zur Analyse der mRNA muss man diese zunächst aus dem Gewebe isolieren und dann in cDNA umschreiben. Bei der Frage, ob ein bestimmtes Gen in der cDNA vorhanden ist, wird dann mit den entsprechenden Primern mittels einer PCR versucht, das interessierende Gensegment zu amplifizieren. Dieses kann nach Gelelektrophorese unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden.

2.7.1 Agarosegel – Elektrophorese

Für die Auswertungen in dieser Arbeit wurde ein Gel der Größe 12 cm x 14 cm wie folgt hergestellt. In einen Erlenmeyerkolben wurden 1,25 g Agarosepulver abgewogen und mit 100ml 1x TAE-Puffer aufgegossen. Unter ständigem Rühren wurde das Gemisch aufgekocht und anschließend für circa 25 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden 4µl GelRed hinzu gegeben und das Ganze blasenfrei auf den Gelträger gegossen, wo es für 30-45 min aushärtete. Zum Schluss wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer circa 1 cm hoch übergossen und nach weiteren 15 min Ruhezeit verwendet.

2.7.2 RNA – Isolierung

Um aus einem Gewebe eine unverdaute RNA isolieren zu können, wurde dieses unmittelbar nach Präparation aus dem Tierkörper in RNAlater gegeben, über Nacht bei 4°C aufbewahrt und dann bei -20° C gelagert. Alle weiteren Schritte wurden in einem RNase-freien Labor durchgeführt. Für die RNA-Isolierung wurde zunächst circa 30 mg des gewünschten Gewebes mit Hilfe eines Skalpells grob zerteilt. Die Gewebestücke wurden anschließend zur Zelllyse in ein Gemisch von 600µl Buffer RA1 + 6µl β-Mercaptoethanol gegeben und gleichzeitig mit dem Homogenisator für circa 30 - 60 s bearbeitet. Das weitere Vorgehen erfolgte mit dem Isolierungs Kit NucleoSpin RNA II Mini an Hand des beigelegten Protokolls. Dabei wurde die einzelsträngige RNA in einem speziellen Vial an eine Matrix gebunden und dann in mehreren Wasch- und Zentrifugationsvorgängen schrittweise isoliert, bis man schließlich die reine RNA in RNase-freiem Wasser gelöst erhielt. Zur Bestimmung der Konzentration der RNA wurde eine UV-Spektrometrie durchgeführt, wobei jeweils 2µl der RNA Lösung mit 70µl eines 10 mM TRIS – Puffer vermischt und dann vermessen wurden. Die Konzentrationsmessung erfolgte über Bestimmung der OD bei 260 nm, wobei 1 OD einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

Abschließend wurde mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese bestätigt, dass die isolierte RNA in einem nicht degradierten Zustand vorliegt. Hierfür wurde 0,5 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 8µl gebracht, mit 2µl des Gel-Loading-Puffers vermischt und in eine Tasche des Gels pipettiert. Anschließend wurde das Gel für 30 min bei 120 V und 30 mA laufen gelassen und anschließend unter der UV-Lampe analysiert. Bei unverdauter RNA erwartet man zwei deutlich sichtbare Banden der 18S- und 28S-Untereinheiten ribosomaler RNA.

Die in ihrer Konzentration bestimmte und verifiziert unverdaute RNA wurde bei -80° C gelagert.

2.7.3 cDNA-Synthese

Bestandteile des cDNA Synthese-Mix	Menge je Probe
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,5 µl
First-Strand-Puffer (5 x)	6,0 µl
M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1,0 µl
Oligo p(dT) ₁₅ – Primer (45 µM)	1,0 µl
RNase-Inhibitor (30 U/µl)	1,0 µl

Tab. 2-3

Für die Herstellung von 30µl cDNA wurde pro Probe zunächst 2 µg RNA in ein auf Eis gekühltes Eppendorf Gefäß gegeben und mit DMDC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 19,5µl gebracht. Dieses Gemisch wurde für 3 min bei 75°C im DNA Thermal Cycler inkubiert, anschließend kurz zentrifugiert und wieder auf Eis gestellt. Die Proben wurden dann nach Zugabe von 10,5µl des cDNA Synthese-Mix für 60 min bei 37°C zur DNA-Synthese inkubiert und zum Ende für 10 min bei 95°C im DNA-Thermal-Cycler erhitzt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben vom Gerät automatisch auf 4°C abgekühlt und für die langfristige Lagerung bei –80°C aufbewahrt.

2.7.4 PCR

Bestandteile des PCR-Mix	Menge je Probe
PCR-Puffer (10 x)	5,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
DMDC-H ₂ O	37,8 µl
dNTP-Mix	0,5 µl
Primer: F/R (20 µM) *	je 1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl

Tab. 2-4. *) Primersequenzen zu den jeweiligen Genen siehe Anhang

Um zu überprüfen, ob ein bestimmtes Gen in der cDNA vorhanden ist, wurde mit Hilfe der PCR versucht, dieses zu amplifizieren, um es dann nach Gelelektrophorese sichtbar

zu machen. Dafür wurden 3µl cDNA mit 47µl des PCR-Mixes in einem Eppendorfgeläß vermischt, zum Verdampfungsschutz zwei Tropfen Öl zugegeben, und dann in den RoboCycler gestellt. Dort wurde die Probe zunächst zur Prädenaturation für 60s auf 94° C erhitzt. Anschließend wurde eine variable Zahl an Zyklen der Amplifikation durchlaufen, die einzeln wie folgt aussehen: Als erstes wurde die Probe 45s lang bei 94° C denaturiert; danach 45s bei einer vom Primer abhängigen Temperatur (jeweilige Temperatur siehe Anhang) für ein Anlegen dieser an die cDNA Matrize (Annealing) inkubiert. Im dritten Schritt verlängerte die DNA-Polymerase, von den Primern ausgehend, die DNA-Stränge eine Minute lang bei 72° C, bevor dann mit dem Erhitzen auf 94° C wieder ein neuer Zyklus begonnen wurde. Wenn die gewünschte Zahl an Zyklen erreicht worden war, wurde die Probe noch einmal für 10 min bei 72° C inkubiert und anschließend bei 4° C gelagert.

Zur Klärung der ursprünglichen Fragestellung, nämlich ob ein bestimmtes Gen in der cDNA-Bank vorhanden ist und wenn ja, in welcher ungefähren Menge, wurde mit dem erhaltenen PCR-Produkt eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 8µl des PCR-Produkts mit 2µl Gel-Loading-Puffer vermengt und das Gemisch in eine Tasche des Agarose-Gels pipettiert. Zusätzlich wurde in mindestens eine Tasche 5µl MassRuler Express als molekularer Gewichtsstandard gegeben, um nachher eine genauere Aussage bezüglich der Masse sichtbarer Banden zu machen. Die Elektrophorese wurde bei 90 V und 70 mA für circa 60-90 min laufen gelassen und anschließend unter der UV-Lampe semiquantitativ ausgewertet.

2.7.5 DNA-Isolierung

Zur Testung der transgenen Fibronectin-Knock-out-Mäuse auf den gewünschten genetischen Hintergrund müssen diese typisiert werden. Dazu wurde DNA der Versuchstiere aus einem abgeschnittenen Stück des Schwanzes isoliert. Dies wurde mit Hilfe des „DNA Isolation Kit“ und dessen vorgegebenen Protokolls durchgeführt, so dass man zum Schluss aufgereinigte DNA erhielt, welche bei 4° C aufbewahrt wurde.

Das Vorhandensein eines bestimmten Gens in der DNA kann mittels einer PCR-Reaktion bei entsprechenden Primern, analog zum Verfahren bei cDNA, überprüft werden. Einzig der erste Prädenaturationsschritt sollte bei genomischer DNA, im Gegensatz zu cDNA, statt einer Minute fünf Minuten dauern. Die Visualisierung erfolgt

ebenfalls nach Gelelektrophorese unter der UV-Lampe. In Bezug auf die Fibronectin-Knock-out-Mäuse wurde das Vorhandensein des Mx-Cre-Gens getestet, welches sich nur in transgenen Tieren befindet.

2.8 Graphische Darstellung und statistische Auswertung der Daten

Im Ergebnisteil sind die Auswertungen der durchgeführten Versuche graphisch dargestellt. Die Graphiken wurden dabei mit Hilfe des Programms „SigmaPlot“ erstellt. Ab einer Fallzahl von $n=3$ wird jeweils der Mittelwert einer Gruppe mit Standardabweichung gezeigt. Bei einer geringeren Fallzahl wurden die Einzelwerte dargestellt. Unter jeder Graphik wird mit „n“ angegeben, wieviele verschiedene Proben pro Gruppe vorhanden waren. In vielen Fällen wurden die einzelnen Proben doppelt gemessen und der Mittelwert beider Messungen zur statistischen und graphischen Auswertung weiterverwendet. In solchen Fällen wird dies durch das Wort „Doppelbestimmung“ unter der Graphik angegeben.

Die Messwerte wurden für die graphische Darstellung unverändert übernommen. Eine Ausnahme hiervon bilden die Abbildungen, bei denen in einer Grafik die Expression eines Gens zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt ist. Da die Expression über die Messung der relativen Lichteinheiten (RLU) bestimmt wird, hängt der Wert maßgeblich von der Belichtungszeit der Aufnahme ab. Um die Messungen einzelner Zeitpunkte mit unterschiedlichen Belichtungszeiten untereinander vergleichen zu können, wurde ein Angleich durch die Multiplikation der Messwerte mit einem spezifischen Faktor durchgeführt. Dieser Faktor wurde durch die Bestimmung der RLUs der MassRuler, die bei allen Auswertungen in gleicher Konzentration auf dem Gel vorhanden sind, ermittelt.

Sämtliche statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms „SigmaStat“ durchgeführt. Es wurden ausschließlich die Werte von zwei Gruppen, in der Regel Versuchs- und Kontrollgruppe, auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dazu wurden im ersten Schritt die zu vergleichenden Messwerte von „SigmaStat“ auf Normalverteilung und gleiche Varianz getestet. Waren diese Voraussetzungen gegeben wurde anschließend ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Im anderen Fall wurde der Wilcoxon-Rangsummentest angewandt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$

festgelegt. Bei einem errechneten $p < 0,05$ wurde die Differenz zwischen den Gruppen als statistisch signifikant, bei einem $p < 0,01$ als statistisch hoch signifikant bezeichnet. In den gezeigten Graphiken wird dies durch das Symbol eines Sterns (*) respektive zweier Sterne (**) dargestellt

3 Ergebnisse

Die Entstehung einer Metastase stellt man sich als einen Vorgang in mehreren Etappen vor. Zunächst lösen sich aus dem Primärtumor einzelne Tumorzellen ab, die dann über Lymph- oder Blutbahnen zu einem entfernten Organ transportiert werden. Dort angekommen können sie sich im Gefäßbett ansetzen und zu einer manifesten Tochtergeschwulst anwachsen. Der Weg der hämatogenen Streuung kann dabei in einem Tiermodell durch intravenöse Injektion von Tumorzellen sehr gut reproduziert werden, was die Möglichkeit eröffnet, die Vorgänge der Ansiedlung experimentell untersuchen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von D5-Melanomzellen nach intravenöser Injektion in C57/Bl6-Mäuse verfolgt. Die Lunge stellt sich in diesem Modell als das einzige Organ heraus, in dem sichtbare Metastasen zu finden sind, was zunächst sicher mit dem physikalischen Steckenbleiben der Tumorzelle im ersten Kapillarbett – nämlich dem der Lunge – nach intravenöser Injektion zusammen hängt. Würden jedoch alle dort fest sitzenden Tumorzellen überleben können, so müsste es zu einer noch wesentlich höheren Zahl an Metastasen kommen. Was also sind die Determinanten, die das Überleben der Tumorzellen in der Lunge bestimmen? In dieser Arbeit soll zuerst ein möglicher Einfluss der Wachstums- und Extravasationsfaktoren VEGF-A und PlGF, anschließend die Bedeutung des Plasmaproteins Fibronectin für die Bildung einer metastatischen Nische untersucht werden.

3.1 Die Bedeutung von VEGF-A und PlGF für die Ansiedlung metastasierender Tumorzellen

3.1.1 Lokale Verfügbarkeit von VEGF-A

Der erste Schritt zur Beurteilung möglicher Auswirkungen von VEGF-A auf die Metastasenbildung bestand darin, zu zeigen, in welchem Maß VEGF-A zum Zeitpunkt der Tumorzellansiedlung überhaupt lokal vorhanden ist. Dazu wurde der Zeitverlauf der VEGF-A-Konzentration im Plasma nach Tumorzellinjektion untersucht.

3.1.1.1 Verlauf der VEGF-A-Konzentration im Plasma nach Tumorzellinjektion

Für die Erstellung eines Zeitverlaufs wurden bei den Versuchsmäusen an den Tagen 0, 2, 3, 4, 6 und 12 nach Tumorzellinjektion Blutproben entnommen und jeweils die Konzentration von VEGF-A im Plasma bestimmt. Die gemessenen Werte sind in Abb. 3.1 dargestellt. Zunächst verbleibt die Konzentration auf dem Wert von circa 50 pg/ml, bevor ab Tag 5 ein Anstieg auf etwa das fünffache stattfindet. Als erste entscheidende Erkenntnis ist also VEGF-A während späterer Phasen der Ausbildung von Metastasen in deutlich erhöhter Konzentration vorhanden. Im nächsten Schritt soll untersucht werden woher das zusätzliche VEGF-A kommt. Dafür kommen in erster Linie drei Zelltypen in Frage: Endothelzellen, Zellen des Lungengewebes und Tumorzellen.

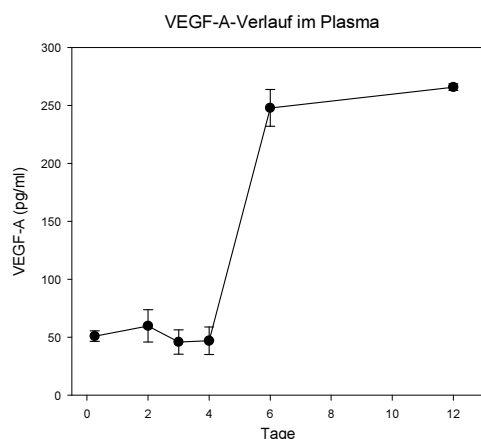


Abb. 3.1: VEGF-A-Konzentrationen im Plasma an verschiedenen Tagen nach Tumorzellinjektion (jeweils $n=3$; Doppelbestimmung)

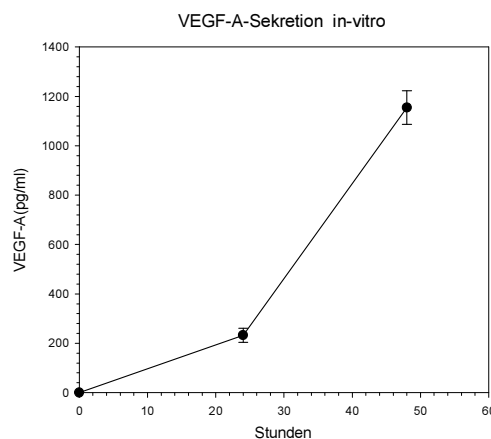


Abb. 3.2: VEGF-A-Konzentrationen im Überstand der Tumorzellkultur B16D5 im Zeitverlauf (jeweils $n=3$; Doppelbestimmung)

3.1.1.2 VEGF-A-Produktion in der Lunge und in den Tumorzellen

Im Lungengewebe der C57-Mäuse kommt es physiologischerweise beständig zu einer VEGF-A-Sekretion. Durch ELISA-Messungen ergeben sich Werte von circa 2 ng/ μ g Protein, wobei nicht zwischen dem Beitrag der Endothel- und der Lungenstromazellen unterschieden werden kann.

Die Fähigkeit der Tumorzellen, VEGF-A zu produzieren wurde in-vitro untersucht: In Abb. 3.2 ist der Verlauf der VEGF-A-Konzentration im Überstand einer Tumorzellkultur (B16D5) dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass die Konzentration

von VEGF-A im Zeitverlauf deutlich ansteigt und somit die verwendeten Tumorzellen in der Lage sind, relevante Mengen an VEGF-A zu produzieren.

Das im Plasma verfügbare VEGF-A entstammt in dem verwendeten Versuchsmodell also sowohl dem Lungengewebe als auch den Tumorzellen. Einen Hinweis darauf, dass aber hauptsächlich die Tumorzellen für den Anstieg der VEGF-A-Konzentration verantwortlich sind, erhält man, wenn man den Verlauf der VEGF-A-Konzentration im Serum (Abb. 3.1) in Zusammenhang mit der Anzahl vitaler Tumorzellen, bestimmt durch Pmel17-Expressionsanalyse, betrachtet.

3.1.1.3 Verlauf der Pmel17-Expression nach Tumorzellinjektion

Pmel17 (im Weiteren: Pmel) ist ein Melanozyten- und auch Melanomzellenspezifisches Protein, das physiologischerweise nicht in der Lunge zu finden ist. Somit kann die Konzentration der zugehörigen Pmel-mRNA als Maß für die Anzahl, der zum Zeitpunkt der Organentnahme in der Lunge befindlichen, lebenden Melanomzellen gelten. In Abb. 3.3 ist der Verlauf der Pmel-Expression dargestellt, wie er an bestimmten Zeitpunkten nach Injektion der Melanomzellen in der Lunge festgestellt wurde.

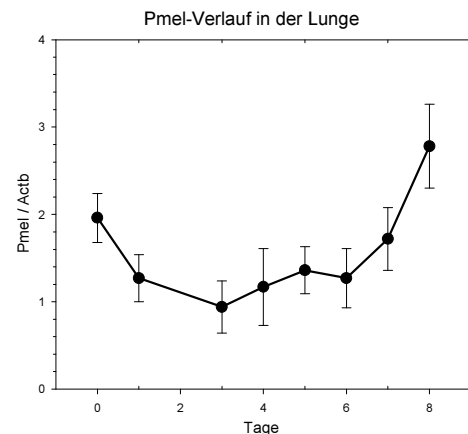


Abb. 3.3: Verhältnis der Expression Pmel/Actb in der Lunge nach Tumorzellinjektion (jeweils n=3)

Da die Menge an Pmel-mRNA nicht in absoluten Zahlen angegeben werden kann, ist sie im Verhältnis zu der des ubiquitär und konstant vorkommenden Proteins Aktin (Gen: Actb) normalisiert. Der Anteil an Pmel, und damit die Anzahl vitaler Tumorzellen, nimmt in den ersten Tagen deutlich ab. Erst ab Tag 4 überwiegt die Zahl der Tumorzellen die sich teilen, gegenüber derjenigen die absterben und der Quotient Pmel/Aktin steigt wieder an. Dieser Zeitpunkt entspricht in etwa dem, ab dem auch die im Serum gemessene Konzentration an VEGF-A stark ansteigt (Abb. 3.1). Es liegt also nahe, dass für den Anstieg von VEGF-A die wachsende Zahl an Melanomzellen verantwortlich ist. In den ersten Tagen vermögen es die vielen zunächst vorhandenen, aber zum Großteil absterbenden Tumorzellen nur die Konzentration ungefähr aufrecht zu erhalten. Doch einige, ganz offensichtlich VEGF-A produzierende Tumorzellen

schaffen es, sich anzusiedeln und durch Wachstum und Vermehrung auch für eine Mehrproduktion an VEGF-A zu sorgen. Das führt zu der Vermutung, dass dem von Tumorzellen sezernierten VEGF-A eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Metastasen zukommt. Diese Annahme soll im Folgenden genauer untersucht werden.

3.1.2 Versuche mit siRNA gegen VEGF-A

Um die Hypothese zu überprüfen, ob sich eine VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen positiv auf deren Ansiedlung auswirkt, wurde hier gezielt die Produktion von VEGF-A in den Tumorzellen einer Versuchsgruppe unterbunden und dann das Outcome in einem Metastasierungsversuch mit dem einer Kontrollgruppe, mit unbehandelten Tumorzellen, verglichen. Die spezifische Blockade der VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen wurde dabei durch Verwendung einer siRNA erreicht.

3.1.2.1 Charakterisierung der transfizierten Tumorzellen

Das Ziel einer Transfektion mit siRNA besteht darin, in den behandelten Zellen die Herstellung eines bestimmten Proteins zu unterbinden. Zum Nachweis einer funktionierenden Blockierung wurden die Zellen in Kultur gegeben und die Konzentration des entsprechenden Proteins im Überstand bestimmt. In Abb. 3.4 sind diese Werte für VEGF-A in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen der verwendeten siRNA gegen VEGF-A dargestellt. Es wird deutlich, dass mit steigender Menge der siRNA die Werte für VEGF-A bis auf ein Minimum zurückgingen und man somit davon ausgehen kann, dass diese Tumorzellen in einem Injektionsversuch keine relevanten Mengen VEGF-A mehr abgeben konnten. Die Ausschaltung einer VEGF-A-Sekretion konnte durch die siRNA-Transfektion in-vitro für mindestens vier bis sechs Tage aufrecht erhalten werden, das heißt nach einer Injektion dieser Zellen in Versuchsmäuse

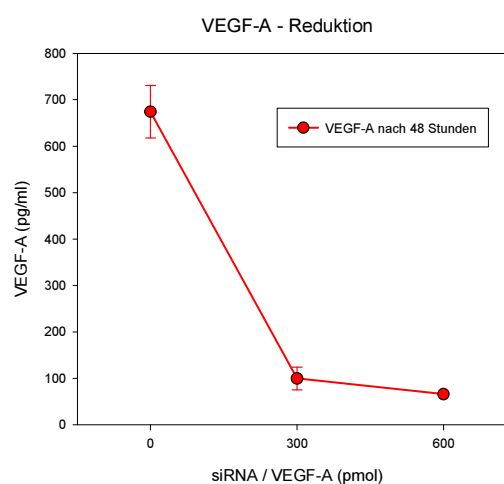


Abb. 3.4: Bestimmung der VEGF-A-Konzentration im Überstand der Tumorzellen, nach Transfektion mit steigender Menge an siRNA/VEGF-A. (jeweils $n=3$; Doppelbestimmung)

war die Blockierung genau während der entscheidenden Phase der Ausbildung einer metastatischen Nische funktionstüchtig. Bevor die transfizierten Tumorzellen in einem Metastasenversuch mit VEGF-A-produzierenden Tumorzellen verglichen wurden, wurde zusätzlich sichergestellt, dass beide Arten von Tumorzellen in-vitro eine gleiche Vitalität zeigten. Bei den Transfizierten ließen sich zwar nach circa 24 Stunden mehr abgestorbene Zellen beobachten, doch nachdem diese in einem Waschvorgang entfernt wurden, waren in Bezug auf das weitere Überlebensverhalten keine Differenzen mehr feststellbar. Unterschiede bei der Ausbildung von Metastasen in dem folgenden Versuch sind also allein auf den veränderten VEGF-A-Spiegel vor Ort zurückzuführen.

3.1.2.2 Metastasierungsversuch in-vivo

Mit Hilfe der siRNA wurde in-vivo untersucht, ob eine blockierte VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen Einfluss auf die Metastasenbildung hat. Dazu wurden den Versuchsmäusen jeweils $2 \cdot 10^5$ D5-Melanomzellen, die mit siRNA gegen VEGF-A behandelt worden waren, intravenös injiziert, während den Mäusen der Kontrollgruppe je $2 \cdot 10^5$ normale, nur mit Lipofektamin scheinbehandelte, D5-Melanomzellen verabreicht wurden. Im Verlauf wurden den Mäusen an mehreren Tagen Blutproben entnommen und schließlich nach zwölf Tagen die zu untersuchenden Organe aus dem Körper entfernt und konserviert. Es wurde jeweils der Oberlappen der linken Lunge für die Auszählung der Metastasen fotografiert. Beispielhaft sind je zwei Bilder aus der Kontrollgruppe (Abb. 3.6 und Abb. 3.6 und Abb. 3.7) und der Versuchsgruppe (Abb. 3.8 und Abb. 3.9) abgebildet.

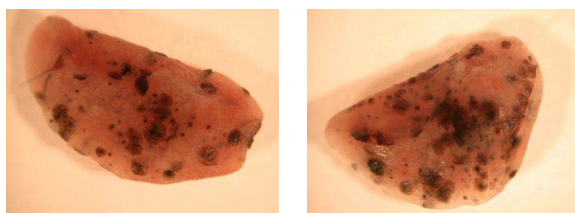


Abb. 3.6 und Abb. 3.7 (Kontrollgruppe)

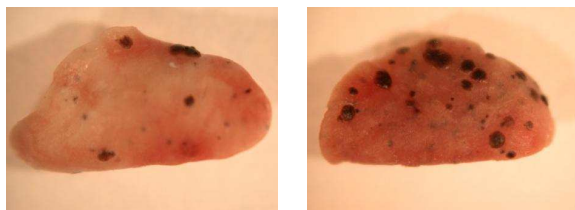


Abb. 3.8 und Abb. 3.9 (siRNA/VEGF-A-Gruppe)

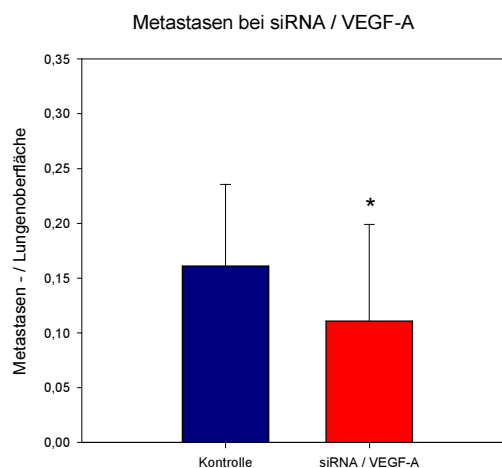


Abb. 3.5: Verhältnis von Metastasenfläche zu Gesamtoberfläche der Lunge in Kontroll- ($n=28$) und siRNA/VEGF-A-Gruppe ($n=22$). Ausgewertet wurden jeweils Lungenober- und -unterseite von 14 bzw. 11 Versuchstieren.

In der Auswertung der Metastasenfläche (Abb. 3.5) ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,034$) zwischen den beiden Gruppen. Durch die Ausschaltung einer VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen erreicht man also eine signifikante Verringerung der Metastasenbildung. Messungen des im Plasma verfügbaren VEGF-A zeigten zudem, dass der in den Kontrollen feststellbare Anstieg der VEGF-A-Konzentration nach Tumorzellinjektion ausbleibt (Abb. 3.10). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Reduzierung der Metastasen tatsächlich auf das verringerte Angebot von VEGF-A vor Ort zurückzuführen ist. Um diese These zu überprüfen, wurden histologische Schnitte der Lunge auf VEGF-A angefärbt (*VEGF-A: grün; Melanomzellen: rot; Zellkerne: blau*). Zu erwarten wäre, dass sich in der Umgebung der Tumorzellen ohne VEGF-A-Produktion auch weniger VEGF-A befindet. Dies lässt sich auch an einigen Schnitten nachweisen. So ist in der Kontrollgruppe (Abb. 3.11) deutlich mehr VEGF-A (*grün*) angefärbt als in der Versuchsgruppe (Abb. 3.12). Allerdings trifft dies nicht für alle Metastasen zu, die in den Färbungen dargestellt wurden. Es lassen sich auch in der Gruppe mit siRNA Metastasen mit VEGF-A-Anfärbung finden. Zu beachten ist, dass die Tumorzellen in diesem Versuch zwölf Tage lang wachsen und sich teilen konnten. Nach diesem

Zeitraum ist die Hemmung der VEGF-A-Produktion nicht mehr als effektiv anzunehmen und die Tumorzellen können wieder Vegfa exprimieren.

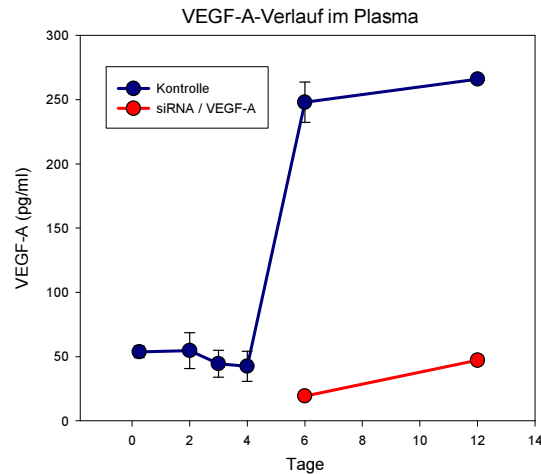


Abb. 3.10: Konzentration von VEGF-A im Plasma von Kontroll- und Versuchsgruppe im Zeitverlauf (jeweils $n=3$; Doppelbestimmung)

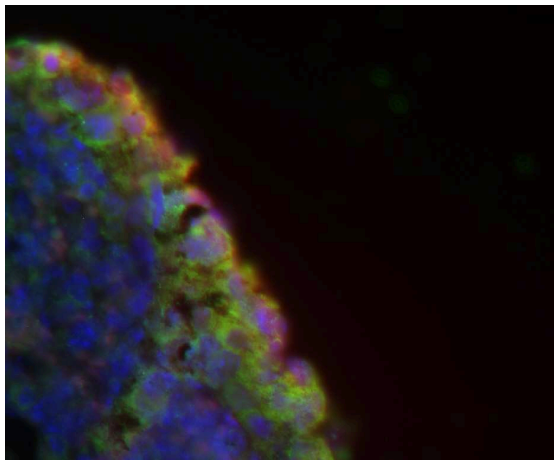


Abb. 3.11: Kontrollgruppe, 40x. grün: VEGF-A; rot: Melanomzellen; blau: Zellkerne

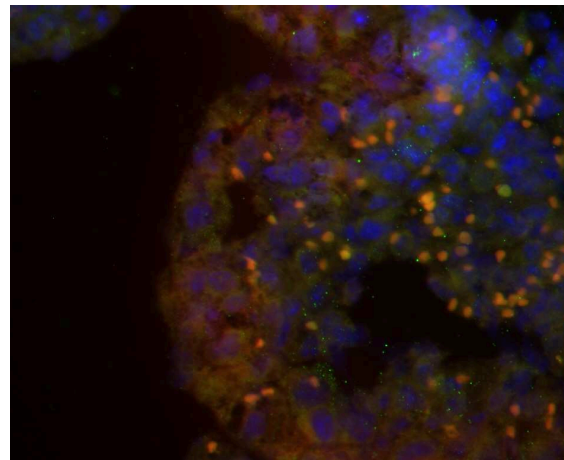


Abb. 3.12: siRNA/VEGF-A-Gruppe, 40x. grün: VEGF-A; rot: Melanomzellen; blau: Zellkerne

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass durch die Ausschaltung von VEGF-A eine signifikante, aber nur mäßige Reduzierung der Metastasen um circa 30 % erreicht wird. Als Gründe für den relativ geringen Rückgang der Metastasierung kommen zwei Mechanismen in Betracht. Entweder kommt es durch die zeitlich beschränkte Unterdrückung der VEGF-A-Produktion für circa 4-6 Tagen zu keinen stärkeren

Überlebensnachteilen, oder die Tumorzellen produzieren als Ersatz für das fehlende VEGF-A alternative Mediatoren, die dessen Funktion ersetzen. Es wurde deshalb in-vitro untersucht, ob die mit siRNA behandelten Tumorzellen den Wegfall von VEGF-A durch Mehrproduktion eines anderen Faktors kompensieren können.

3.1.2.3 Anstieg der PlGF-Produktion unter siRNA/VEGF-A-Behandlung

Ein Faktor, der auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu VEGF-A einen Ausfall kompensieren könnte, ist PlGF. Um zu überprüfen, ob sich die Konzentration von PlGF in Abwesenheit von VEGF-A verändert, wurden D5-Melanomzellen mit steigenden Mengen an siRNA/VEGF-A transfiziert und in Kultur gegeben. Sowohl PlGF als auch VEGF-A wurden jeweils nach 48 Stunden im Überstand der Kultur bestimmt. Wie auf Abb. 3.13 zu sehen, zeigt die Konzentration von PlGF einen geradezu indirekt proportionalen Anstieg zum Abfall von VEGF-A und wird offensichtlich von den Tumorzellen zum Ausgleich verstärkt produziert. Damit liegt die Vermutung nahe, dass PlGF auch bei den in-vivo-Versuchen mit siRNA/VEGF-A vermehrt vorhanden war und die Metastasenbildung beeinflussen konnte.

Ein Anstieg der PlGF-Konzentration im Plasma der Versuchsmäuse aus dem vorangegangenen Versuch wurde, bei Messungen an Tag 2, 7 und 12, nur an Tag 7 festgestellt, da die PlGF-Konzentrationen ansonsten in allen Gruppen unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methoden lagen (Ergebnisse nicht gezeigt). Dennoch kann auf Grund der in-vitro-Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass durchgehend mehr PlGF verfügbar war. Es sollte folglich untersucht werden, ob die Zunahme der PlGF-Konzentration die Versuche mit siRNA/VEGF-A relevant beeinflusst hat. Dies wäre der Fall, wenn PlGF selber Auswirkungen auf die ansiedelnden Tumorzellen hätte. Im nächsten Schritt wurde also überprüft, ob PlGF die Bildung von Metastasen beeinflusst.

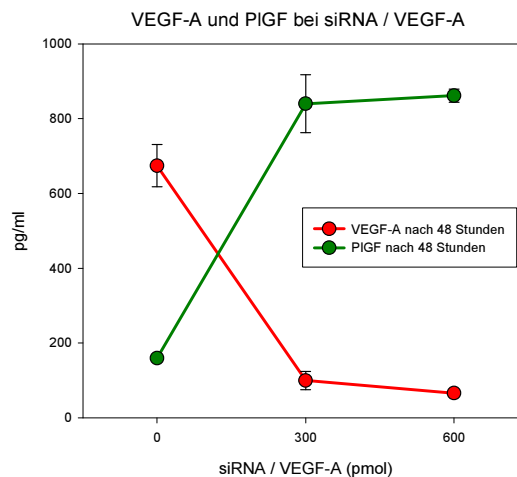


Abb. 3.13: Konzentration von VEGF-A und PlGF im Überstand, bei Transfektion mit steigender Menge siRNA/VEGF-A (jeweils n=3; Doppelbestimmung)

3.1.3 Versuche mit siRNA gegen PlGF

Die Rolle des PlGF bei der Ansiedlung von Tumorzellen wurde durch Ausschaltung der Produktion dieses Faktors in den Tumorzellen mit Hilfe von siRNA untersucht.

3.1.3.1 Charakterisierung der transfizierten Tumorzellen

Zunächst wurde die Wirksamkeit der Transfektion mit einer gegen PlGF gerichteten siRNA gezeigt. Dazu wurden die mit 600 pmol siRNA/PlGF behandelten Tumorzellen in Kultur gegeben und nach 48 Stunden die Konzentrationen von PlGF und VEGF-A im Überstand gemessen. Zum Vergleich wurden Tumorzellen parallel einmal mit siRNA/VEGF-B und in einem weiteren Ansatz mit siRNA/VEGF-A der gleichen Konzentration transfiziert und kultiviert. Die siRNA/VEGF-B sollte weder die Produktion von PlGF, noch die von VEGF-A beeinträchtigen und dient somit als Kontrolle. In Abb. 3.14 ist an Hand von repräsentativen Daten gezeigt, dass sich die Produktion von PlGF in den Tumorzellen durch Transfektion mit siRNA/PlGF unterdrücken lässt. Zur Veranschaulichung ist auch noch einmal der enorme Anstieg der PlGF-Konzentration bei siRNA/VEGF-A mit abgebildet. Durch die zusätzliche Bestimmung der VEGF-A-Konzentration im Überstand der Tumorzellkulturen konnte außerdem gezeigt werden, dass es nicht zu einem kompensatorischen Anstieg von VEGF-A bei Wegfall von PlGF – ähnlich wie im umgekehrten Fall – kommt. In Bezug auf Vitalität und Teilungsraten zeigten die mit siRNA/PlGF transfizierten Zellen ein

gleiches Verhalten wie gänzlich unbehandelte D5-Melanomzellen und konnten somit für einen Metastasierungsversuch in-vivo verwendet werden.

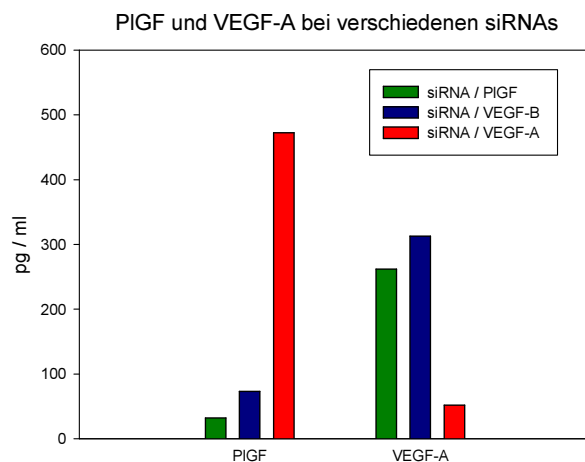
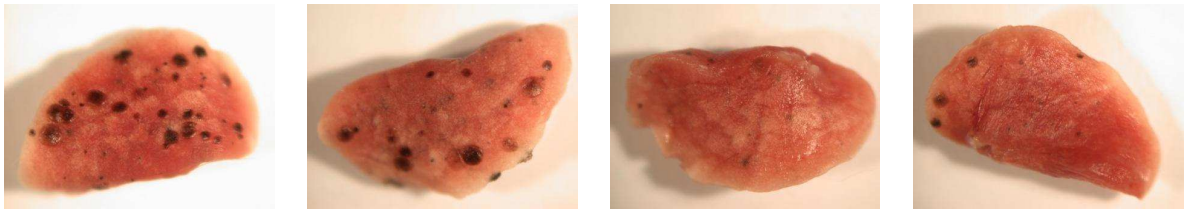


Abb. 3.14: Konzentrationen von PIGF und VEGF-A im Überstand der Tumorzellen bei Transfektion mit verschiedenen siRNAs. In der Abbildung werden Daten eines repräsentativen Experiments aus drei durchgeführten Experimenten gezeigt.

3.1.3.2 Metastasierungsversuche in-vivo

In diesem Versuch bekamen insgesamt acht Versuchsmäuse jeweils $2 \cdot 10^5$ mit siRNA/PIGF transfizierte D5-Melanomzellen intravenös injiziert, während acht Kontrollmäuse je $2 \cdot 10^5$ unbehandelte D5-Melanomzellen erhielten. Nach zwölf Tagen wurden die Tiere getötet und die Lungen zur Auswertung der sichtbaren Metastasen entnommen. (Kontrollgruppe: Abb. 3.15 und Abb. 3.16; siRNA/PIGF-Gruppe: Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Wie auf den Bildern zu sehen, sind die Metastasengrößen in den beiden Gruppen sehr unterschiedlich. Es empfiehlt sich also eine Flächenauswertung der Metastasen, da eine reine Auszählung die vorhandene Metastasenlast nicht korrekt widerspiegeln würde. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.19 dargestellt und zeigen, dass sich durch die Ausschaltung einer PIGF-Produktion in den Tumorzellen die Ausbildung von Metastasen drastisch reduzieren lässt. (Median: Kontrolle: 0,127; siRNA/PIGF: 0,036; $p < 0,001$). Die Unterdrückung der PIGF-Produktion in den Tumorzellen führt also – mehr noch als bei VEGF-A – zu einer Reduzierung der Metastasierung.



Kontrollgruppe: Abb. 3.15 und Abb. 3.16

siRNA/PlGF-Gruppe: Abb. 3.17 und Abb. 3.18

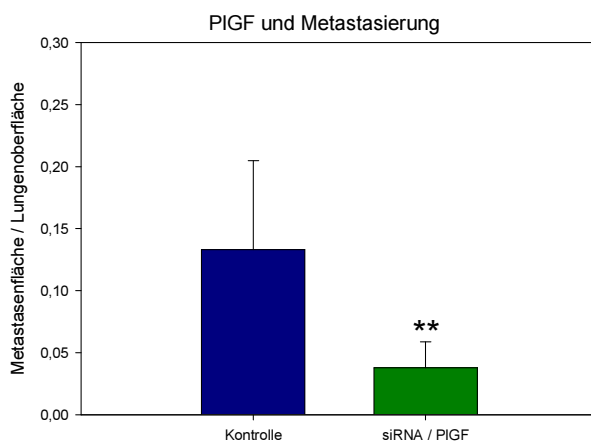


Abb. 3.19: Verhältnis der Metastasenfläche zur gesamten Lungenoberfläche in Kontroll- und siRNA/PlGF-Gruppe an Tag 12 (jeweils n=8)

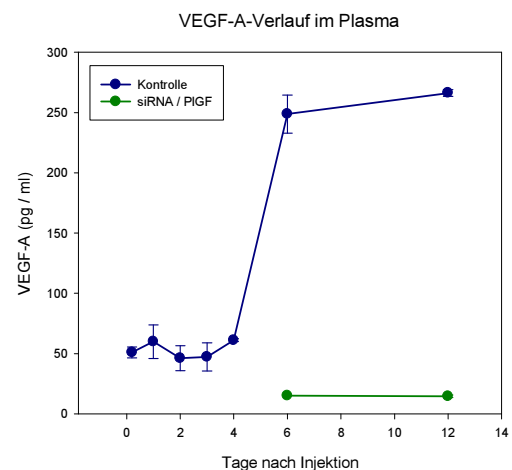


Abb. 3.20: Konzentration von VEGF-A im Plasma von Kontroll- und Versuchsgruppe (jeweils n=3; Doppelbestimmung)

Es wurde zudem untersucht ob sich der Ausfall von PlGF auf die VEGF-A-Konzentration im Plasma so auswirkt, wie es im umgekehrten Fall gesehen worden war. In Abb. 3.20 sind die an Tag 6 und Tag 12 in der siRNA/PlGF-Gruppe gemessenen Werte von VEGF-A im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der in der Kontrollgruppe ablaufende Anstieg von VEGF-A ab Tag 6 in der siRNA/PlGF-Gruppe ausbleibt. Da von einer normalen VEGF-A-Produktion der Tumorzellen ausgegangen werden kann zeigt dies, dass zu diesen Zeitpunkten in der Versuchsgruppe bereits deutlich weniger Tumorzellen vorhanden sind.

3.1.4 Versuche mit siRNA gegen VEGF-A und PlGF

Nachdem bisher gezeigt werden konnte, dass die Bildung von Metastasen sowohl durch die Ausschaltung von VEGF-A als auch von PlGF verringert wird, soll untersucht werden, ob durch die Blockierung beider Faktoren gleichzeitig eine weitere Steigerung

der Metastasenreduktion erreicht werden kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Versuchstiere (n=6) D5-Melanomzellen erhielten, die sowohl mit siRNA gegen VEGF-A als auch gegen PlGF transfiziert wurden. Nach zwölf Tagen wurden die Lungen wie üblich ausgewertet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die unbehandelte Tumorzellen erhielt, zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Metastasen. Allerdings stellt sich in Bezug auf die Gruppe, bei der in den Tumorzellen alleine PlGF unterdrückt wurde, kein signifikanter Unterschied dar. Das heißt, die zusätzliche Blockierung von VEGF-A hat keinen messbaren Effekt auf die Tumorzellansiedlung. Zur Ergänzung wurde noch eine Blockierung des VEGF-B (n=10) untersucht, was aber im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keinen signifikanten Unterschied führt. Alle Ergebnisse in der Zusammenfassung sind in Abb. 3.21 dargestellt.

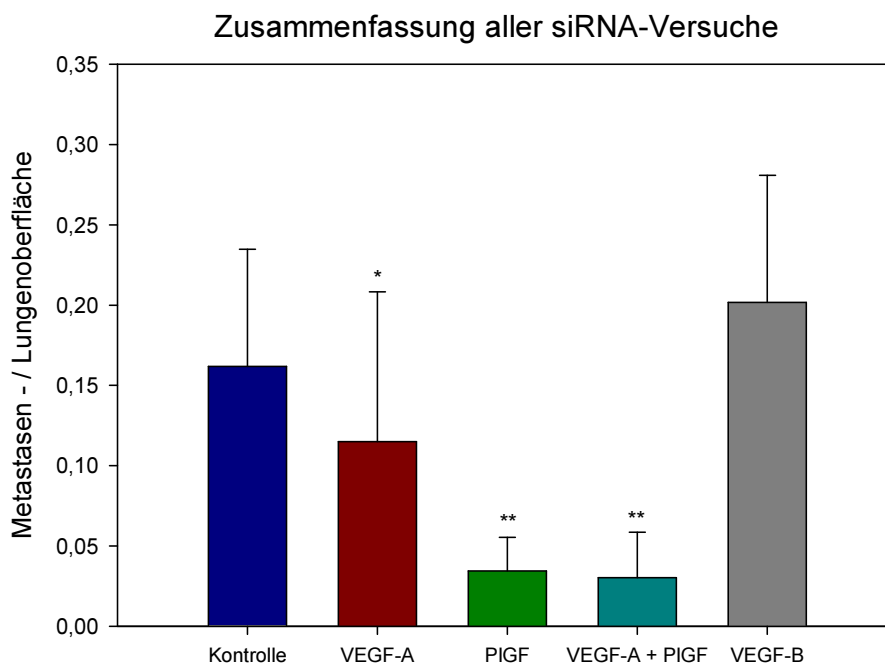


Abb. 3.21: Verhältnis der Metastasenfläche zur gesamten Lungenoberfläche an Tag 12 bei Transfektion mit verschiedenen siRNAs. (siRNA jeweils gegen das genannte Protein gerichtet) Die mit „*“ markierten, signifikanten Unterschiede sind jeweils auf die Kontrolle bezogen.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden: Durch die Ausschaltung der VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen reduziert sich die Ausbildung von Metastasen. Dies geschieht in einem noch höheren Ausmaß bei der Verhinderung einer PlGF-Produktion.

Durch eine gleichzeitige Blockierung beider Faktoren gleichzeitig ist dem gegenüber keine weitere Steigerung mehr zu erreichen.

Als nächster Punkt stellt sich die Frage wie es zu den gezeigten Differenzen kommt. Wirkt sich das Fehlen von VEGF-A bzw. PlGF bereits auf die frühe Ansiedlung der Tumorzellen, oder erst in der weiteren Proliferation aus? Dafür wurden in Tierversuchen frühe Zeitpunkte der Metastasenbildung, also genau während der ersten Schritte der Ansiedlung, untersucht.

3.1.5 Versuche zu frühen Zeitpunkten der Metastasierung

In den vorangegangenen Versuchen wurden Unterschiede im Ausmaß der Metastasierung zwischen den einzelnen Gruppen immer zwölf Tage nach Injektion der Tumorzellen festgestellt. (VEGF-A-Gruppe: Tumorzellen mit siRNA gegen VEGF-A; PlGF-Gruppe: Tumorzellen mit siRNA gegen PlGF; Kontrollgruppe: Tumorzellen ohne siRNA). Die Vorgänge zur Bildung einer metastatischen Nische beginnen jedoch schon unmittelbar nach Ankunft der Tumorzellen im Lungengefäßbett, also nur sehr kurze Zeit nach intravenöser Injektion. Deshalb stellt sich die Frage, ob VEGF-A beziehungsweise PlGF auch schon in dieser Phase das Überleben oder Verhalten der Tumorzellen beeinflussen. Dazu wurden frühe Zeitpunkte, nämlich 2, 24 und 48 Stunden nach Tumorzellgabe, zur Organentnahme angesetzt. Anschließend wurde analysiert, ob Unterschiede durch Ausschaltung von VEGF-A respektive PlGF zu beobachten sind. In diesen Stadien der Metastasengröße sind sowohl makroskopische als auch mikroskopische Verfahren ungeeignet, um Veränderungen zu erkennen. Eine Alternative hierzu stellen molekularbiologische Genexpressionsanalysen dar.

Einen ersten Anhalt, ob es durch Blockierung von VEGF-A oder PlGF auch schon früh zu einem veränderten Überleben der Tumorzellen kommt, gewinnt man aus der Analyse der Pmel-Expression in der Lunge. Pmel dient als Marker für die Anzahl vitaler Tumorzellen. In Abb. 3.22 sind die Messwerte, normalisiert mit dem Wert des „house-keeping“-Gens Gapdh, von allen drei Versuchsgruppen aufgetragen, wie sie nach 2, 24 und 48 Stunden in der Lunge erhoben wurden. Nach zwei Stunden bestehen noch keinerlei Unterschiede zwischen den Messwerten. Im Verlauf fallen die Werte – wie erwartet – in allen Gruppen stark ab, die PlGF-Gruppe jedoch am stärksten, so dass schon nach 24 Stunden eine Differenz zur Kontrollgruppe feststellbar ist. Diese

Differenz bleibt auch nach 48 Stunden bestehen, wo beide Gruppen einen ähnlichen, leichten Anstieg der Pmel-Expression zeigen. In der VEGF-A-Gruppe kommt es hingegen zu einem weiteren leichten Absinken, wodurch sie sich nach 48 Stunden dann ebenfalls von der Kontrollgruppe unterscheiden lässt. Auch wenn die Messwerte noch sehr nahe zusammen liegen, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass sich Tumorzellen ohne VEGF-A- beziehungsweise PlGF-Wirkung schlechter ansiedeln können.

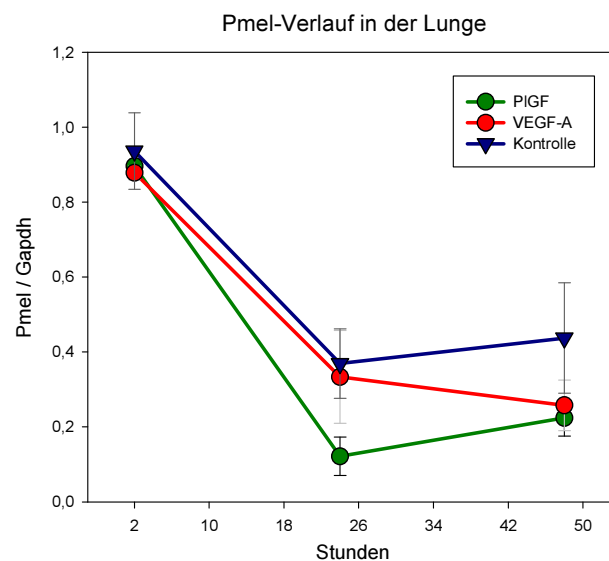


Abb. 3.22: Verhältnis der Expression Pmel/Gapdh der einzelnen Gruppen im Zeitverlauf (jeweils $n=3$; Doppelbestimmung)

Es wurde bisher gezeigt, dass die Ausschaltung von VEGF-A und PlGF zu einer Reduzierung der Metastasierung führt. Deutliche Hinweise gibt es, dass sich dabei das Fehlen der Faktoren schon innerhalb der ersten 48 Stunden nach Injektion der Tumorzellen auswirkt. Im nächsten Schritt soll nun untersucht werden auf welche Weise die Ausschaltung von VEGF-A und PlGF für die Reduzierung der Tumorzellzahl sorgt. Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: Entweder können die behandelten Tumorzellen schlechter in der Lunge verbleiben und kommen somit vermehrt in anderen Organen vor, oder sie schaffen es weniger gut, sich den Gegebenheiten in der Lunge anzupassen und sterben somit vermehrt vor Ort ab. Beide Ansätze schließen sich gegenseitig keinesfalls aus, sondern können nebeneinander bestehen. Anhand von Expressionsanalysen wurden im Folgenden eine Reihe von

Genen gescreent, die eine Aussage über das Verhalten der Tumorzellen am Ort der Ansiedlung liefern können.

3.1.5.1 Untersuchung der Vorgänge in der Lunge

Eine mögliche Erklärung für die verringerte Metastasenzahl in den Versuchsgruppen lautet, dass die mit siRNA behandelten Tumorzellen aufgrund der fehlenden VEGF-A-beziehungsweise PlGF-Wirkung schlechter in der Lunge überleben und sich deswegen dort schlechter ansiedeln können. Gründe hierfür könnten der vermehrte lokale Zelltod durch Apoptose oder Nekrose, beziehungsweise durch gesteigerte zytotoxische Signale des Immunsystems sein. Aus diesen Gründen wurde die Expression entsprechender Markergene in den einzelnen Versuchsgruppen untersucht.

Als Marker für Apoptose und Nekrose dienten die Genexpression der Enzyme Casp3 sowie RipK3 (Receptor interacting protein Kinase 3), deren jeweiliger Verlauf in Abb. 3.23 und Abb. 3.24 dargestellt ist. Bei Casp3 zeigt sich nach 2 Stunden, dass die Kontrollgruppe die höchsten Werte hat. Diese Verhältnisse drehen sich im Zeitverlauf um, es kommt bei der VEGF-A- und PlGF-Gruppe zu einem Anstieg, während die Kontrollgruppe zunächst bei 24 Stunden abfällt. Nach 48 Stunden befinden sich die Werte aller Gruppen annähernd auf dem gleichen Niveau. Bei RipK3 findet man nach zwei und 24 Stunden ähnliche Verhältnisse wie bei Casp3. Anschließend sinken die Werte der VEGF-A- und PlGF-Gruppe ab und es sind keine klaren Differenzen zwischen den Gruppen zu sehen.

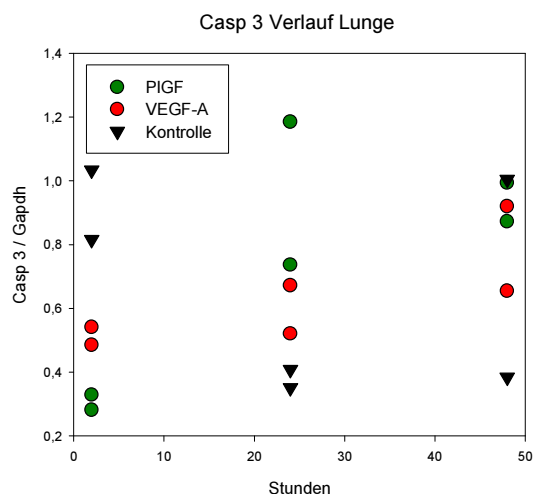


Abb. 3.23

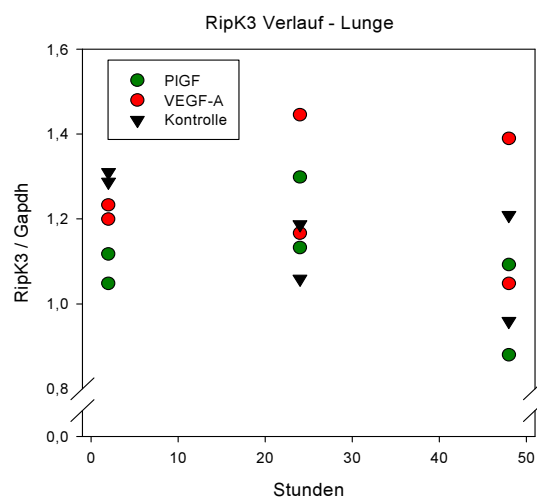


Abb. 3.24

Marker für Apoptose und Nekrose; Verhältnis der Expression von Casp3 bzw. RipK3 zu Gapdh in den einzelnen Gruppen im Zeitverlauf (jeweils n=2; Doppelbestimmung)

Absterbende Tumorzellen stellen einen lokalen Reiz für das Immunsystem dar. Das Ausmaß der Immunantwort hat direkten Einfluss auf das Überleben und damit auf die Ansiedlung der Tumorzellen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine Blockade der VEGF-A- oder PIGF-Produktion in den Tumorzellen Einfluss auf die Immunantwort des Körpers hat. Die möglichen Immunreaktionen lassen sich in spezifische und unspezifische Komponenten unterteilen. Als Indikatorgene für unspezifische Abwehr wurden gewählt: Crp (C-reactive protein), Tnfsf10 (Tumor necrosis factor superfamily, member 10), Ptx3 (Pentraxin related gene 3) und KlrK1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1). Bezüglich des Crp (Abb. 3.25) kommt es im Zeitverlauf sowohl in der VEGF-A- als auch in der PIGF-Gruppe zu einem kontinuierlichen Anstieg. Die Messungen der Kontrollgruppe ergeben schon nach zwei Stunden höhere Werte, fallen nach 24 Stunden zwischenzeitlich allerdings ab, so dass keine Unterschiede zwischen den Gruppen mehr zu sehen sind. Auch bei Tnfsf10 (Abb. 3.26) und Nkg2d (Abb. 3.27) zeigen die Werte der VEGF-A-Gruppe eine durchgehende Zunahme, während die der PIGF-Gruppe nach 48 Stunden wieder leicht absinken. In den Lungen der Kontrollmäuse zeigen diese Parameter in einem Fall einen leichten Abfall über die Zeit (Tnfsf10) und einmal eher einen Anstieg (KlrK1). Ptx3 (Abb. 3.28) hingegen ist bei den Kontrollen in den ersten 24 Stunden überhaupt nicht nachzuweisen und steigt erst nach 48 Stunden an. In der PIGF-Gruppe werden bei Ptx3

durchweg höhere Werte als in der Kontrolle gemessen. Nach dem Anstieg der Expression in der Kontrollgruppe nach 48 Stunden sind die Unterschiede zwischen den Gruppen nur noch gering. Insgesamt ergeben sich also deutliche Hinweise auf eine gesteigerte Ptx3-Expression in den siRNA-Gruppen vor allem in den ersten 24 Stunden, was auf eine gesteigerte Antwort des unspezifischen Immunsystems schließen lässt.

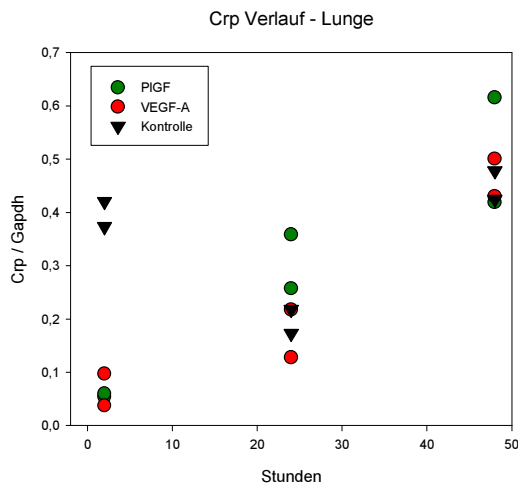


Abb. 3.25

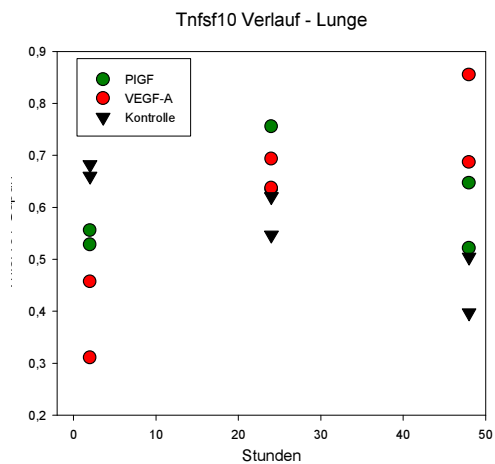


Abb. 3.26

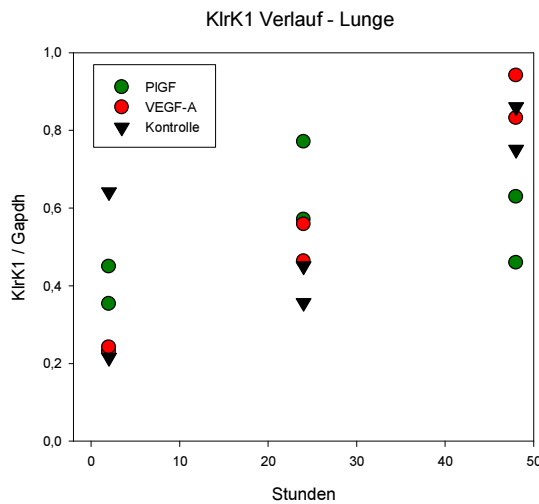


Abb. 3.27

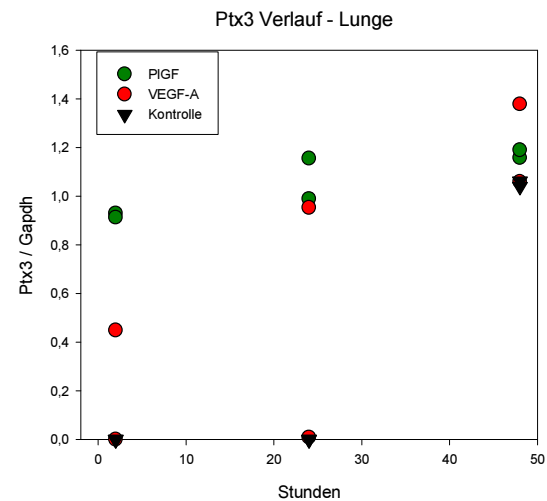


Abb. 3.28

Abb. 3.25 - Abb. 3.28: Marker unspezifischer Immunantwort; Verhältnis der Expression von Crp, Tnfsf10, KlrK1 und Ptx3 jeweils zu Gapdh in den einzelnen Gruppen im Zeitverlauf (jeweils n=2; Doppelbestimmung)

Als Markergene, die Hinweise auf eine spezifische Abwehrreaktion zeigen, wurden CD8a (CD8 Antigen; Abb. 3.29), welches von zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird, sowie die Enzyme Granzyme-A (Gzma; Abb. 3.30) und Perforin-1 (Prf1; Abb. 3.31), die in den Granula spezifischer Abwehrzellen gespeichert werden, gewählt. In allen drei Versuchsgruppen stieg das Signal für CD8a im Verlauf der ersten 48 Stunden an. Dabei zeigen sich in der PlGF-Gruppe die höchsten Expressionswerte. Die Expression von Gzma und Prf1 nimmt in der VEGF-A- und der Kontrollgruppe erst nach 24 Stunden zu, während die PlGF-Gruppe schon nach zwei Stunden hohe Werte aufweist. Diese steigen im weiteren Verlauf noch an, zeigen aber bei Prf1 nach 48 Stunden einen Abfall bis unter die Nachweisgrenze. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse aber darauf hin, dass die spezifische Immunantwort in den ersten Tagen insbesondere in der siRNA/PlGF-Gruppe verstärkt abäuft und somit für die Unterschiede in der Metastasenzahl verantwortlich gemacht werden könnte.

Ein eigenständiger Faktor, dessen positiver Einfluss auf die Metastasenbildung hier schon gezeigt wurde, ist VEGF-A selbst. Dabei kann VEGF-A nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von anderen lokalen Zellen, wie zum Beispiel Endothelzellen, gebildet werden. Folglich wurde untersucht, ob sich durch die Injektion der verschieden behandelten Tumorzellen Unterschiede in Expression von Vegfa in der Lunge feststellen lassen. In Abb. 3.32 sind die Ergebnisse im Verlauf zu sehen. Alle drei Gruppen zeigen relativ hohe Signale für Vegfa. In der PlGF-Gruppe ergeben sich im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen ab 24 Stunden nach Injektion höhere Werte, wobei die Differenzen gering bleiben. Damit scheint sich die Expression von VEGF-A nicht wesentlich durch die transfezierten Tumorzellen beeinflussen zu lassen.

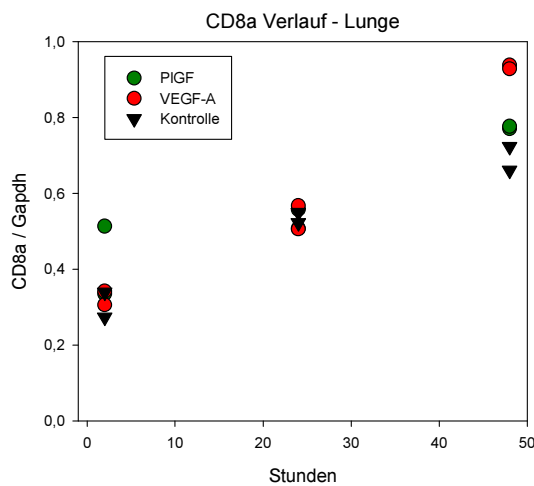


Abb. 3.29

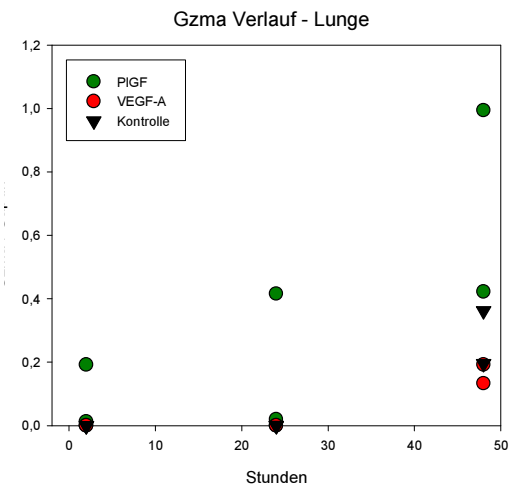


Abb. 3.30

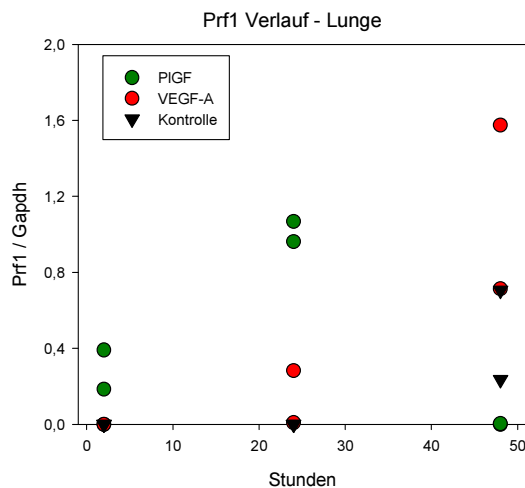


Abb. 3.31

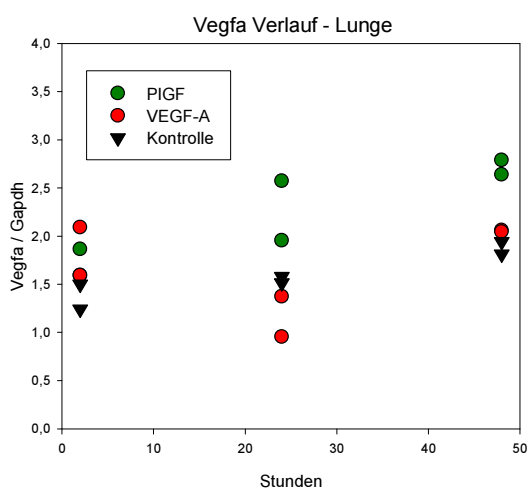


Abb. 3.32

Abb. 3.29 - Abb. 3.31: Marker spezifischer Immunantwort: Verhältnis der Expression von CD8a, Gzma und Prf1 jeweils zu Gapdh in den einzelnen Gruppen im Zeitverlauf. Abb. 3.32: Verhältnis der Expression von Vegfa/Gapdh in den einzelnen Gruppen im Zeitverlauf. Bei allen jeweils: n=2; Doppelbestimmung.

Neben den bisher besprochenen Genen gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, für die in anderen Untersuchungen eine Beteiligung an der Tumorzellansiedlung gezeigt werden konnte. Diese sind der Plasminogenaktivator Plau (Plasminogen-activator, Urokinasetyp), das EZM-vernetzende Lox (Lysiloxidase), die Invasions-fördernde Mmp9 (Matrix-Metalloproteinase 9) und das an Adhäsionsvorgängen beteiligte Cxcr4 (Chemokine-receptor 4).

In den beiden Gruppen mit transfizierten Tumorzellen kommt es bei den Messwerten für Plau (Abb. 3.33) und Lox (Abb. 3.34) im Verlauf der ersten 48 Stunden zu einer kontinuierlichen Zunahme, ausgehend von einem relativ niedrigen Wert. Die Kontrollgruppe weist dagegen nach zwei Stunden höhere Expressionswerte auf, die bei 24 Stunden allerdings fast bis auf null zurückgehen, um anschließend wieder anzusteigen. Ein anderes Bild zeigt sich in Bezug auf Mmp9 (Abb. 3.35): VEGF-A- und Kontrollwerte steigen erst ab 24 Stunden zunächst minimal, nach 48 Stunden deutlich an. In der PlGF-Gruppe ist Mmp9 schon nach zwei Stunden stärker exprimiert, hat nach 24 Stunden ein Maximum und verschwindet nach 48 Stunden komplett. Für Cxcr4 (Abb. 3.36) findet sich in allen Gruppen ein relativ ähnlicher Verlauf, nämlich ein leichter Anstieg von einem bereits hohen Startwert ausgehend. Dabei sind die Werte der VEGF-A-Gruppe stets etwas höher als die der Kontrollgruppe. Zusammenfassend sind jedoch bei keinem der in diesem Abschnitt untersuchten Gene deutliche Unterschiede in der Expression festzustellen.

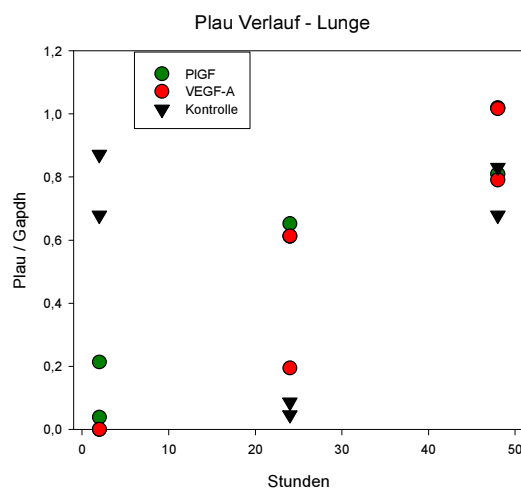


Abb. 3.33

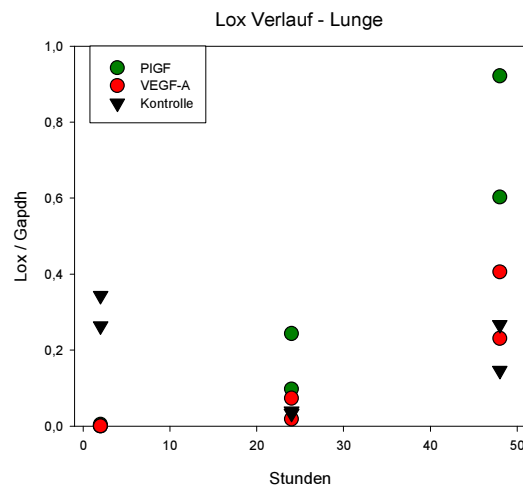


Abb. 3.34

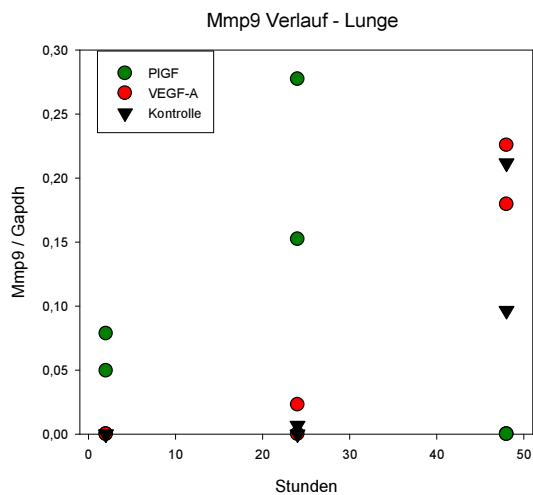


Abb. 3.35

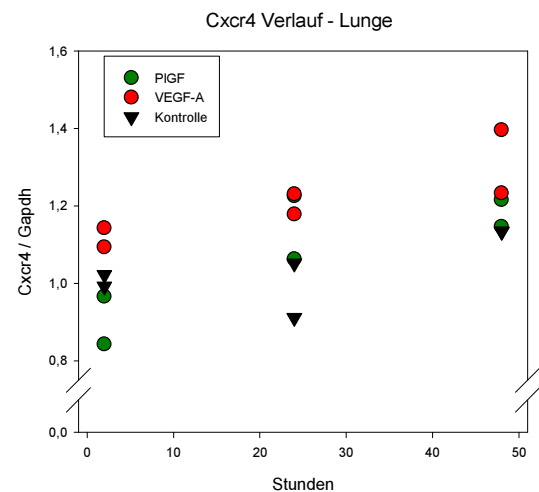


Abb. 3.36

Abb. 3.33 - Abb. 3.36: Testung Nischen-assoziiierter Gene. Verhältnis der Expression von *Plau*, *Lox*, *Mmp9* und *Cxcr4* jeweils zu *Gapdh* in den einzelnen Gruppen im Zeitverlauf. (jeweils $n=2$; Doppelbestimmung)

Die bisherigen Ergebnisse aus den Untersuchungen zu frühen Zeitpunkten weisen darauf hin, dass es durch die Blockade der VEGF-A- bzw. PlGF-Produktion in den ersten Tagen zu einer schlechteren Ansiedlung der Tumorzellen in der Lunge kommt. Als mögliche Ursachen dafür wurden Marker für Apoptose, Nekrose, Immunreaktionen und eine Reihe weiterer Faktoren, die Einfluss auf das lokale Überleben haben könnten, untersucht. Dabei zeigten sich in den meisten Fällen keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Es ergaben sich aber in den Expressionsanalysen von *Ptx3*, *CD8a*, *Gzma* und *Prfl* Hinweise darauf, dass es durch die Blockade der VEGF-A- bzw. PlGF-Produktion zu einer verstärkten Entzündungsreaktion kommt.

Ausgehend davon, dass sich die Tumorzellen ohne VEGF-A bzw. PlGF schlechter in der Lunge ansiedeln können, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob es dafür im Gegenzug zu einem vermehrten Auftreten von Tumorzellen in anderen Organen kommt.

3.1.5.2 Untersuchungen in Leber und Milz

In den vorangegangenen Untersuchungen ergaben sich aus den Daten zur *Pmel*-Expression Hinweise, dass schon in den ersten Tagen nach Injektion weniger vitale Tumorzelle in der Lunge zu finden sind, wenn in diesen die VEGF-A- oder die PlGF-

Produktion blockiert wurde. Neben der Möglichkeit, dass durch die Unterdrückung dieser Faktoren das Überleben der Tumorzellen vor Ort erschwert wird, könnte der verringerte VEGF-A- beziehungsweise PlGF-Spiegel auch dazu führen, dass den Tumorzellen die Extravasation erschwert wird, sie dadurch länger im Blutgefäß bleiben und schließlich leichter durch den Blutstrom aus der Lunge entfernt werden. In dem Fall müssten sie vermehrt in anderen, vom Blutstrom her nachgeschalteten Organen auftauchen. Dieser Frage sollte durch Untersuchung der häufigen Metastasierungsorgane Leber und Milz nachgegangen werden.

Zunächst wurde der Verlauf der Pmel-Expression in den beiden Organen untersucht. In beiden Fällen ergaben sich Expressionsstärken die deutlich unter der in der Lunge gemessenen Pmel-Expression lagen. In der Leber (Abb. 3.37) kommt es in allen Gruppen zu einem leichten Anstieg der Expression nach 48 Stunden. Eindeutige Differenzen zwischen den Gruppen sind nicht auszumachen. Auch in der Milz (Abb. 3.38) geht das Expressionssignal im Zeitverlauf für alle Proben nach oben, aber im Vergleich zur Leber bei gleichem Maßstab deutlich steiler. Die Werte der VEGF-A-Gruppe sind nach 48 Stunden über denen der Kontrollgruppe. Wesentliche Unterschiede zwischen den Gruppen sind allerdings nicht festzustellen. Es kann also festgehalten werden, dass sich weder in der Leber noch in der Milz klare Hinweise für eine erhöhte Ansiedlung von Tumorzellen in Abhängigkeit von VEGF-A und PlGF finden lassen.

Insgesamt zeigt sich in der Leber in allen Gruppen im Vergleich zur Milz nur ein sehr schwaches Signal, weshalb für die Pmel-Messung in der Leber fünf PCR-Zyklen mehr durchlaufen worden sind, um eine vergleichbare Expressionsstärke zu erreichen. Das deutet daraufhin, dass die Gegebenheiten in der Leber wesentlich ungünstiger für die verwendeten D5-Melanomzellen sind, als in der Milz. Am Ende der Versuche nach zwölf Tagen finden sich aber weder in Milz, noch in der Leber makroskopische Metastasen.

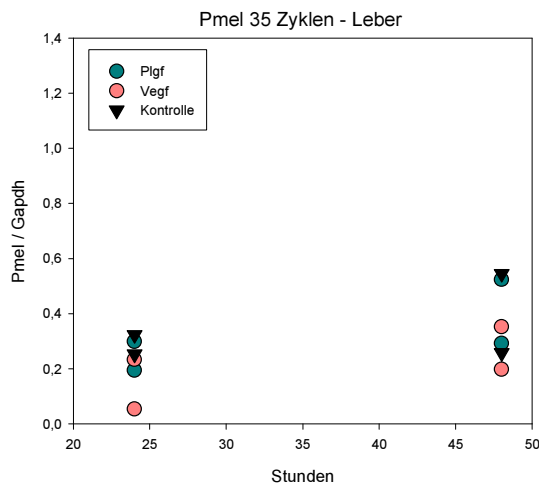


Abb. 3.37

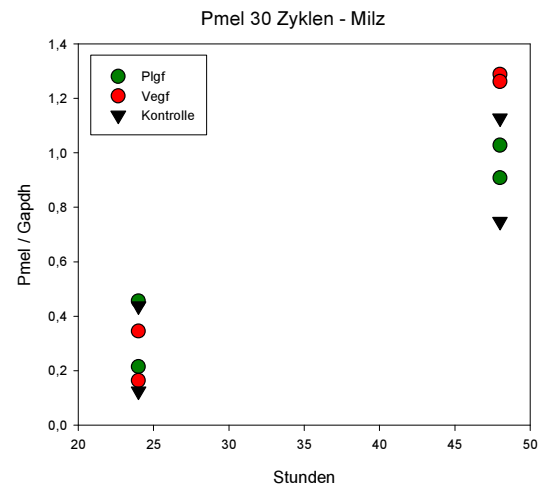


Abb. 3.38

Hinweise auf Melanomzellen in Leber und Milz. Expressionsverhältnis von Pmel/Gapdh in den einzelnen Gruppen im Zeitverlauf. (jeweils n=2; Doppelbestimmung)

Zusätzlich wurde hier untersucht, ob es in diesen Organen zu einer unterschiedlich ausgeprägten Immunantwort zwischen den Versuchsgruppen kommt. Sollten sich deutliche Unterschiede zeigen, wäre dies ein Hinweis darauf, dass in der entsprechenden Gruppe mehr Tumorzellen in der Leber respektive Milz vorhanden sind. Dafür wurden ähnlich wie in der Lunge entsprechende Markergene der spezifischen und unspezifischen Abwehr analysiert.

Als Indikatoren für unspezifische Abwehrvorgänge dienten die Expressionsprofile von Tnfsf10, Klrk1 und Crp, deren Verläufe in Leber und Milz in den Graphiken Abb. 3.39 - Abb. 3.43 dargestellt sind. Bei keinem der Parameter kam es zwischen den einzelnen Gruppen zu Unterschieden in der Expression, weder in der Leber noch in der Milz. Die Crp-Expression in der Milz (Abb. 3.43) steigt als einzige im Verlauf in allen Gruppen an, was bedeutet, es kommt unabhängig von der Gruppenzuordnung zu einer Steigerung einer Entzündungsreaktion, wobei die Werte der Kontrolle leicht unterhalb der der anderen beiden Versuchsgruppen liegen. In der Leber als physiologischem Produktionsort wurde eine Crp-Analyse auf Grund konstant hoher Werte nicht durchgeführt. In der Zusammenschau aller Werte lässt sich feststellen, dass die Marker der unspezifischen Abwehr sowohl in der Milz als auch in der Leber keine Differenzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen liefern.

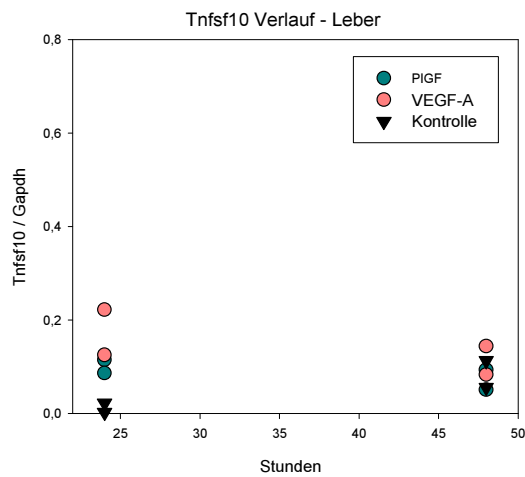


Abb. 3.39

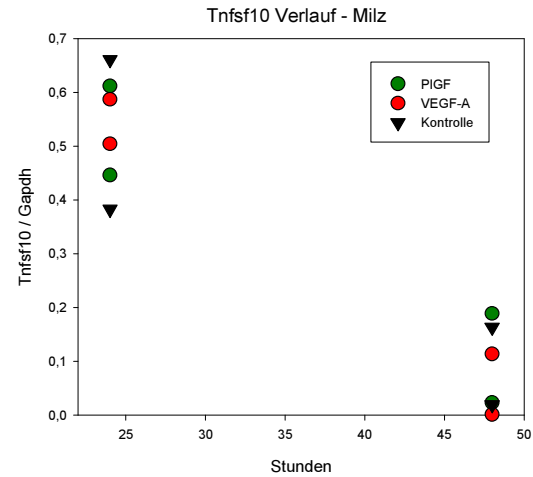


Abb. 3.40

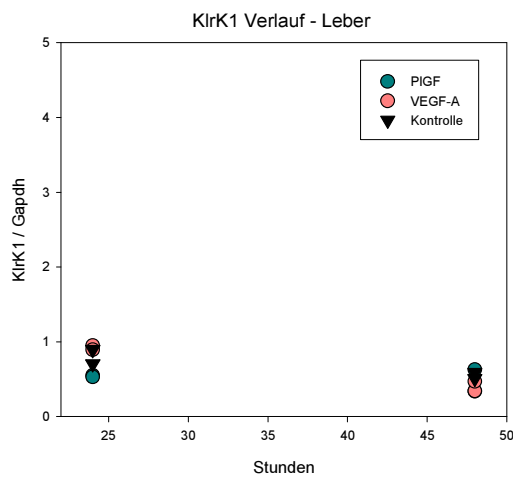


Abb. 3.41

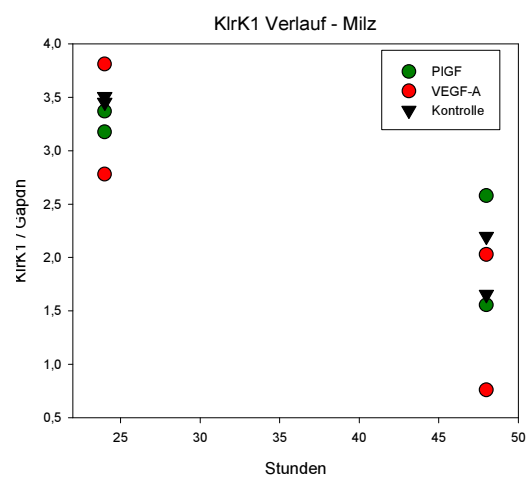


Abb. 3.42

Abb. 3.39 - Abb. 3.43: Marker unspezifischer Immunantwort. Verhältnis der Expression von *Tnfsf10*, *KlrK1* und *Crp* jeweils zu *Gapdh* in Leber und Milz. Bestimmung in den einzelnen Gruppen nach 24 und 48 Stunden. (jeweils $n=2$; Doppelbestimmung)

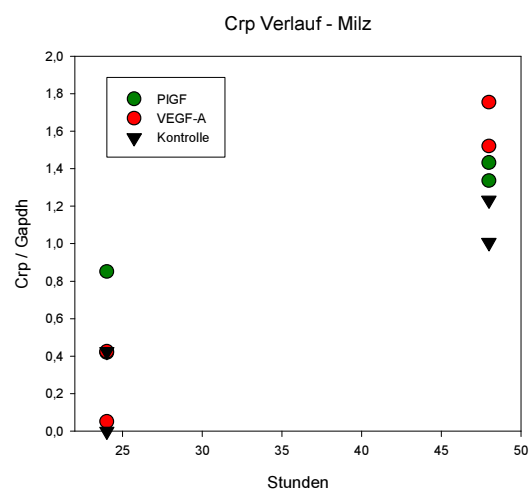


Abb. 3.43

In der Auswertung von CD8a, als Zeichen der spezifischen Abwehr, lag das Signal in beiden Proben, sowohl in der Milz als auch in der Leber, unter der Nachweisgrenze. Dagegen konnte die RNA der zytotoxischen Enzyme Gzma und Prf1 nachgewiesen werden. Die Expression von Prf1 steigt im Zeitverlauf fast in allen Proben der Leber (Abb. 3.44) und der Milz (Abb. 3.45) an. Nach 24 Stunden sind dabei noch keine Unterschiede zwischen den Gruppen abgrenzbar, nach 48 Stunden zeigen sich bei der VEGF-A-Gruppe in der Milz und bei der PlGF-Gruppe in der Leber klar höhere Werte. Bei der Beurteilung von Gzma in der Milz weist ebenfalls die PlGF-Gruppe die höchsten Werte auf, VEGF-A- und Kontrollgruppe zeigen kaum Unterschiede (Abb. 3.46). In der Leber wiederum ist Gzma in keiner der Gruppen nachweisbar.

Zusammenfassend ergaben sich aus den Untersuchungen von Leber und Milz keine eindeutigen Hinweise darauf, dass sich die Blockade der VEGF-A- oder PlGF-Produktion in den Tumorzellen auf die Ansiedlung in diesen Organen auswirkt. In Bezug auf die Ausschaltung von VEGF-A ist festzuhalten, dass das Pmel-Signal in den ersten 48 Stunden stärker ansteigt als in der Kontrollgruppe. Gleiches gilt für die Marker einer Immunantwort (u.a. Prf1 und Crp). Da sich in der Milz auch nach 12 Tagen keine makroskopischen Metastasen finden lassen, kann daraus abgeleitet werden, dass in der Milz wohl zunächst mehr Tumorzellen vorhanden sind, diese aber durch eine stärker aktivierte Immunantwort beseitigt werden.

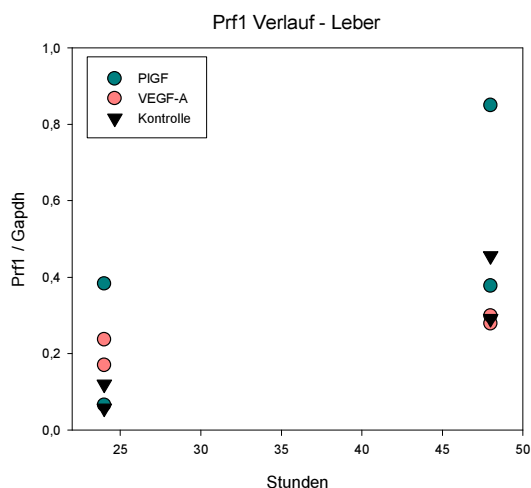


Abb. 3.44

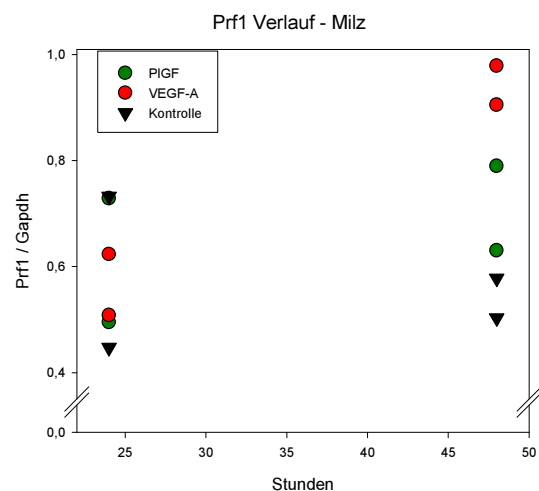


Abb. 3.45

Abb. 3.44 - Abb. 3.46: Marker spezifischer Immunantwort. Verhältnis der Expression von *Prfl* und *Gzma* zu *Gapdh* in Leber und Milz. Bestimmung in den einzelnen Gruppen nach 24 und 48 Stunden. (jeweils $n=2$; Doppelbestimmung)

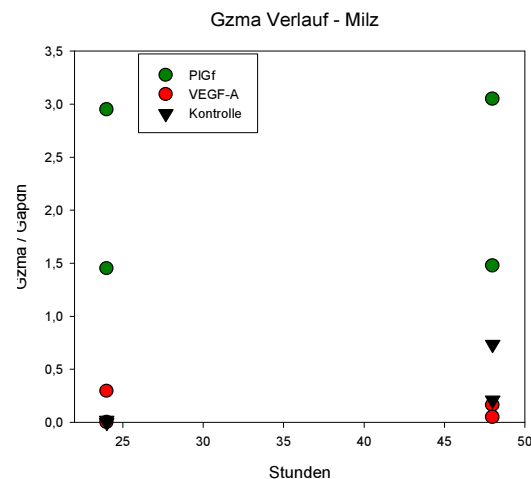


Abb. 3.46

Alle bis hierhin durchgeführten Untersuchungen, ob in der Lunge, oder in Leber und Milz hatten zum Ziel, die Art und Weise besser zu verstehen, wie von Tumorzellen produziertes VEGF-A und PIGF das Verhalten bei der Ansiedlung in einem fremden Organ beeinflussen. Dass sie es tun, wurde durch geringere Metastasenbildung in Tierversuchen eindeutig gezeigt (siehe Abb. 3.21). Beiden Faktoren werden dabei neben bisher besprochenen Wirkungen, auch eine Mitgestaltung der Nische durch Einflussnahme auf Fibronectin zugesprochen. Dabei ist jedoch noch nicht letztendlich geklärt, ob, und wenn ja in welchem Maße, Fibronectin überhaupt an der Ansiedlung von Tumorzellen beteiligt ist. Diese Frage zu klären, ist das Ziel der folgenden Versuche.

3.2 Die Bedeutung von Fibronectin für den Vorgang der Metastasierung

Der erste Schritt zur Beurteilung der Beteiligung von Fibronectins an der Metastasierung besteht darin, zu klären, in welchem Maße Fibronectin vor Ort überhaupt vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurden Versuchsmäusen jeweils $2 \cdot 10^5$ D5-Melanomzellen injiziert. Anschließend wurden sie zu vorher definierten Zeitpunkten getötet, um den Fibronectingehalt in der Lunge mittels Western-Blot-Messungen zu bestimmen. In Abb. 3.47 ist der Zeitverlauf der Fibronectinmenge zu sehen, an Hand dessen deutlich wird, dass Fibronectin gegenüber dem Normalwert schon einen Tag

nach Injektion in der Lunge deutlich vermehrt zu finden ist. Das heißt, Fibronectin ist in jedem Fall an den Vorgängen, die sich nach Ankunft der Tumorzellen in der Lunge abspielen, beteiligt. Zu klären ist allerdings, woher die Zunahme an Fibronectin stammt. Dafür in Frage kommen das Lungengewebe, die Tumorzellen – in beiden Fällen wäre es zelluläres Fibronectin (cFn) – sowie das Blutplasma, dann in Form des plasmatischen Fibronectins (pFn).

Sowohl die im Lungengewebe befindlichen Fibroblasten als auch die verwendeten Tumorzellen sind in der Lage, Fibronectin zu produzieren. Für die D5-Melanomzellen wurde dies mittels eines Western Blots zur Detektion von Fibronectin im Überstand der Zellkultur beziehungsweise im Tumorzelllysate gezeigt. (Abb. 3.48). Die Produktion von Fibronectin durch Fibroblasten im Lungengewebe von Mäusen lässt sich aus im Internet frei zugänglichen Genexpressionsprofilen entnehmen (UniGene Mm.193099).

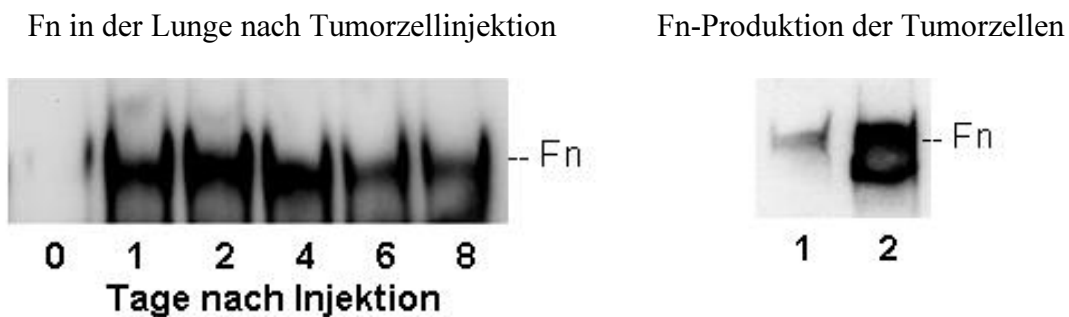


Abb. 3.47: WB; Bestimmung von Fn im Lungenlysat an den Tagen nach Tumorzellinjektion

Abb. 3.48: WB; Bestimmung von Fn in der Tumorzellkultur;
1: Zelllysate; 2: Überstand

Neben den Tumorzellen und den Fibroblasten kommt auch das Plasma als mögliche Herkunft des Fibronectins in Frage. Dort ist pFn in relativ hoher Konzentration vorhanden (ca. 300 µg/ml) und zudem auch für die Tumorzellen im Gegensatz zu cFn sofort in großer Menge verfügbar. Daher erscheint es sinnvoll, sich primär dem pFn zuzuwenden.

Die Bedeutung von pFn für die Ausbildung von Metastasen wurde in einem Tiermodell untersucht. Dafür wurde pFn in einer Versuchsgruppe ausgeschaltet und diese dann mit einer Kontrollgruppe bezüglich der Metastasenbildung zu vergleichen. Ein

vollkommenes Verschwinden von pFn wird ausschließlich in Mäusen erreicht, bei denen die entsprechende Geninformation in den Leberzellen, welche für die Produktion zuständig sind, ausgeknockt wurde. Deshalb wurden die folgenden Versuche mit solchen pFn^{-/-}-Mäusen durchgeführt.

3.2.1 Verifizierung eines pFn – Knockout

Ein klassischer Knockout des Fibronectingens ist für die Mäuse noch in der Embryonalzeit letal, weshalb hier das Modell eines konditionellen Knockouts verwendet wurde. Dabei wird das Fibronectingen erst nach einem externen Stimulus (poly(dI-dC)-Gabe) von einem hierdurch aktivierten Enzym („Mx-Cre“-Rekombinase) aus dem Genom der Leberzellen entfernt. Die Rekombinase erkennt bestimmte Gensequenzen („loxP-Sites“), welche das Fibronectingen flankieren, entfernt die Information zwischen ihnen und verbindet die freien Enden des DNA-Strangs. Als Ergebnis erhält man die genetische Ausschaltung der Fibronectininformation in den mit poly(dI-dC) behandelten Mäusen.

Zur Verifizierung eines Knockouts wurde mit allen Versuchsmäusen folgendermaßen verfahren. Zunächst erfolgte eine genetische Testung mittels PCR-Amplifikation, ob die entsprechende Information für die Rekombinase Mx-Cre vorhanden war. In Abb. 3.49 ist beispielhaft eine Gelelektrophorese gezeigt, an Hand derer deutlich zu erkennen ist, dass sich bis auf in Line 6 und Line 8 Mx-Cre im Genom befindet. Im nächsten Schritt wurden alle Mäuse mit einer dreimaligen, intraperitonealen poly(dI-dC)-Gabe behandelt. Durch poly(dI-dC) wurde eine Virusinfektion nachgeahmt und so eine Entzündungsreaktion in den Mäusen induziert. Die Aktivierung des Interferon-Promotors „Mx“ führte dann zur Expression der Cre-Rekombinase. Nach einer Latenzzeit von zwei Wochen war die entzündliche Reaktion wieder abgeklungen und die Versuche mit den Mäusen wurden durchgeführt. Am Ende des Versuchs, also bei Tötung der Tiere, wurde aus entnommenen Blutproben jeweils die Konzentration von Fibronectin im Plasma durch Western Blot bestimmt. In Abb. 3.50 wird deutlich, dass bei den Proben 1, 3 und 5 pFn vorhanden ist, während bei den Proben 2 und 4 sich kein pFn mehr im Plasma befindet, was beweist, dass bei den entsprechenden Mäusen ein Knockout erfolgreich induziert wurde.

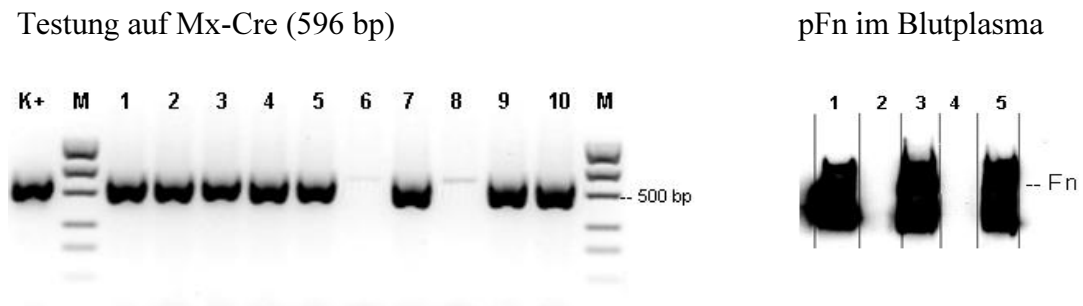


Abb. 3.49. Gelelektrophorese zum Nachweis von Mx-Cre; K+: Positiv-Kontrolle; M: MassRuler; Line 1-10: DNA-Proben der Versuchsmäuse.

Abb. 3.50: WB; Bestimmung von pFn im Plasma induzierter Mäuse. Line 1, 3 und 5 positiv Line 2 und 4 negativ

3.2.2 Metastasierungsversuch in-vivo

Zunächst wurde untersucht, ob sich durch die Ausschaltung von pFn grundsätzlich die Zahl der Metastasen verändern lässt. Dafür bekamen insgesamt fünf Kontroll- und 13 pFn-K.o.-Mäuse (pFn^{-/-}) je $2 \cdot 10^5$ D5-Melanomzellen intravenös injiziert. Nach zwölf Tagen wurden die Organe entnommen und die linken Oberlappen der Lunge jeweils von Ober- und Unterseite für die Auswertung fotografiert. Beispielfhaft sind aus beiden Gruppen je zwei Fotos gezeigt (Kontrolle: Abb. 3.51 und Abb. 3.52; pFn^{-/-}: Abb. 3.53 und Abb. 3.54). Um die beiden Gruppen zu vergleichen, wurde die Anzahl der sichtbaren Metastasen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.55 dargestellt. Durch die Abwesenheit von pFn reduziert sich die Anzahl an Metastasen von einem Mittelwert von $31,4 \pm 11,9$ in der Kontrollgruppe auf $7,2 \pm 5,3$ in der Versuchsgruppe. Dabei ist der Unterschied statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$).

Bei einer Auswertung nach der Metastasenfläche kommt man ebenfalls auf eine hochsignifikante Differenz (Abb. 3.56) und auch eine Pmel-Expressionsanalyse (Abb. 3.57) zeigt einen statistisch eindeutigen Unterschied zwischen den Gruppen.

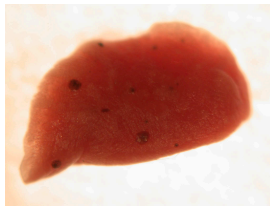


Abb. 3.51

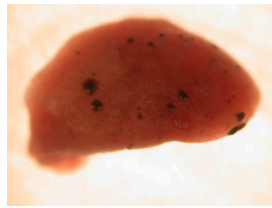


Abb. 3.52

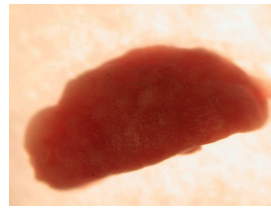


Abb. 3.53

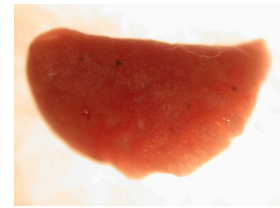


Abb. 3.54

Kontrollgruppe

$pFn^{-/-}$ -Gruppe

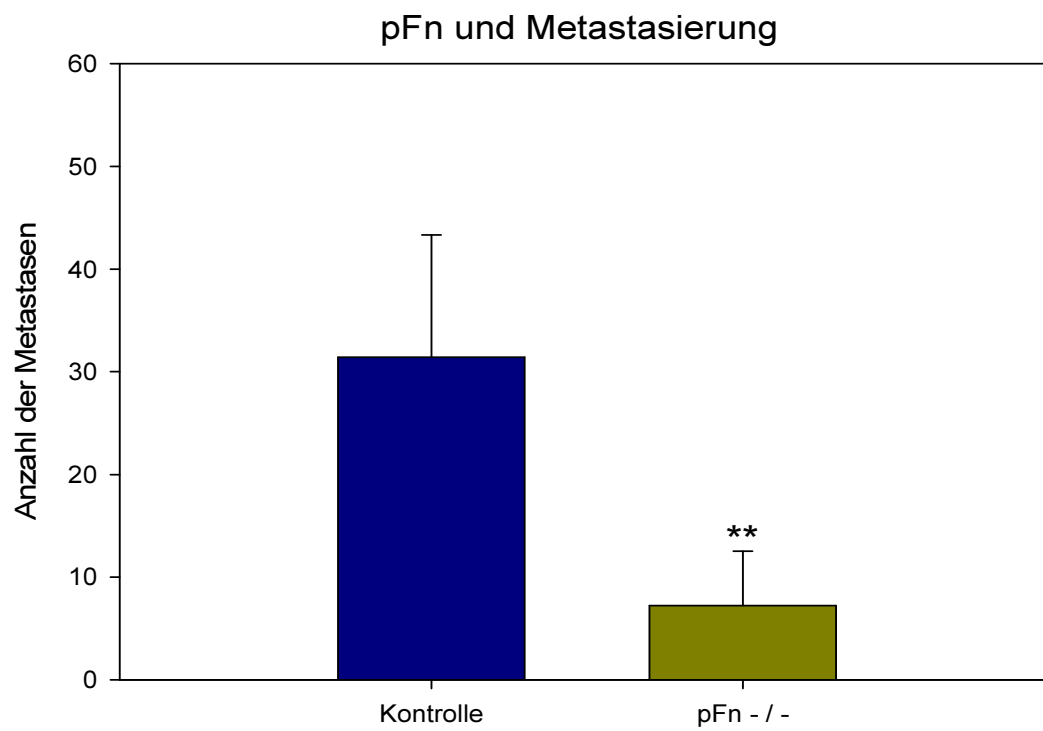


Abb. 3.55: Mittlere Anzahl der pro Lungenseite sichtbaren Metastasen an Tag 12 in Kontroll- ($n=10$) und $pFn^{-/-}$ -Gruppe ($n=26$)

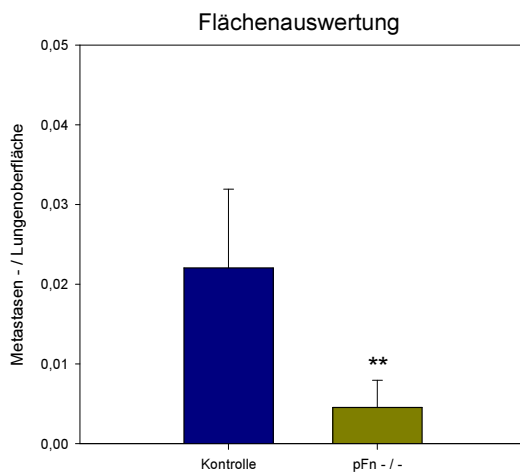


Abb. 3.56: Verhältnis der Metastasenfläche zur Gesamtoberfläche der Lunge an Tag 12 in den beiden Versuchsgruppen.

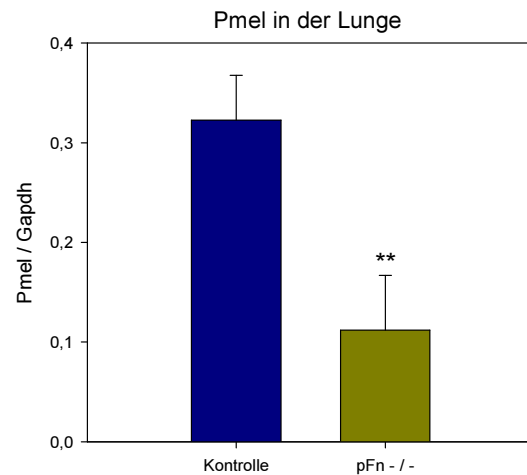


Abb. 3.57: Expressionsverhältnis von Pmel/Gapdh in der Lunge an Tag 12 in den beiden Versuchsgruppen.

Diese Ergebnisse liefern einen eindeutigen Nachweis, dass plasmatisches Fibronectin die Bildung von Metastasen nach intravenöser Tumorzellinjektion unterstützt. Bei einem Wegfall kommt es zu einer drastischen Reduzierung der Tumorzellansiedlung in der Lunge.

Ausgehend von der Hypothese, dass die Tumorzellen ohne pFn schlechter in der Lunge adhären können, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob es nach Knockout von pFn zu einem vermehrten Auftreten von Tumorzellen in anderen Organen kommt.

3.2.3 Untersuchung von Leber, Milz und Niere

Als mögliche Organe für eine Metastasierung wurden Leber, Milz und Niere ausgewählt. Es wurden zwölf Tage nach Tumorzellinjektion aus insgesamt vier Kontroll- und drei K.o.-Mäusen die entsprechenden Organe entnommen. Da makroskopisch keine Metastasen zu erkennen waren, wurde jeweils die RNA isoliert und die Besiedelung mit Tumorzellen über Pmel-Expressionsanalyse überprüft. Dabei fand sich in der Auswertung bei keinem der Organe ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 3.58).

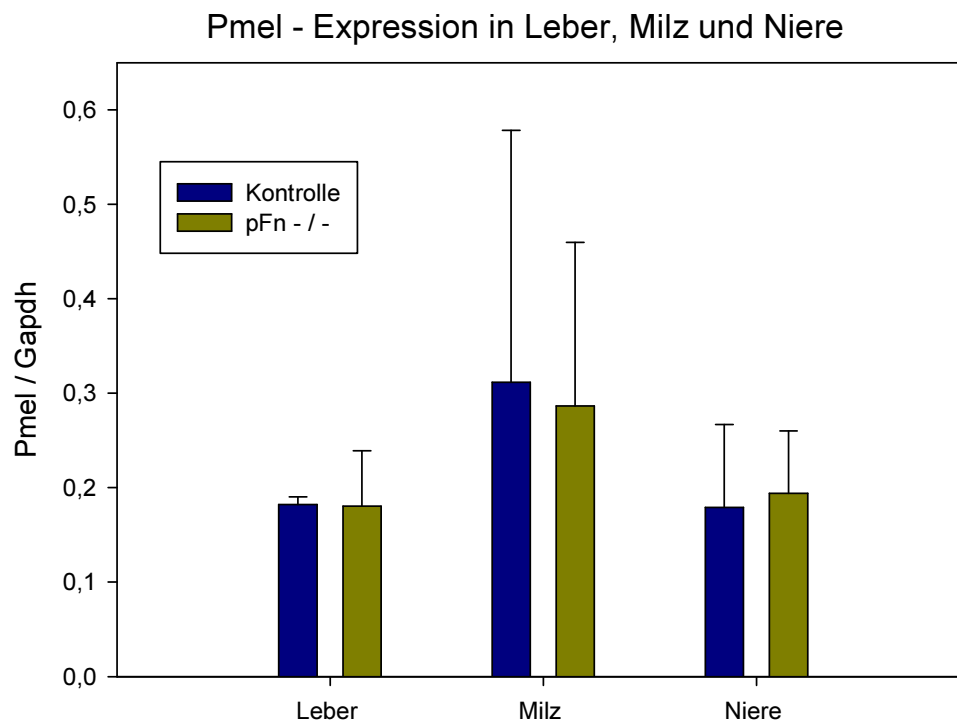


Abb. 3.58: Expressionsverhältnis von *Pmel/Gapdh* in verschiedenen Organen an Tag 12. Bestimmung jeweils in 4 Kontroll- und 3 *pFn*^{-/-}-Mäusen.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Ausschaltung von *pFn* zwar zu weniger Metastasen in der Lunge, aber zu keiner Veränderung in anderen, nachgeschalteten Organen führt. Dies wurde hier für den Zeitpunkt zwölf Tage nach Injektion der Tumorzellen gezeigt.

Die Tumorzellen kommen mit *pFn* in Berührung sobald sie im Gefäßsystem angelangt sind, also unmittelbar am Beginn des Versuchs. Es lässt sich daher die Hypothese aufstellen, dass sich ein Fehlen von *pFn* nicht erst nach zwölf Tagen, sondern auch schon in den ersten Tagen nach Injektion auf die Tumorzellen auswirkt. Um dies zu prüfen, wurden Metastasierungsversuche durchgeführt, bei denen diesmal die Entnahme der Organe zu früheren Zeitpunkten erfolgte.

3.2.4 Untersuchung zu frühen Zeitpunkten

Um Aufschluss über den frühen Verlauf der Metastasierung zu erhalten, wurden *pFn*^{-/-}-Mäusen und Kontrollmäusen jeweils $2 \cdot 10^5$ D5-Melanomzellen injiziert und nach 2 Stunden (3 *pFn*^{-/-}; 4 Ko.), 24 Stunden (4 *pFn*^{-/-}; 3 Ko.) und 48 Stunden (7 *pFn*^{-/-}; 3 Ko.)

aus dem Versuch genommen. Nach diesem kurzen Zeitraum waren auf den Organen noch keine Metastasen sichtbar, weswegen sich die Fotoauswertung der Lungen erübrigte. Durchgeführt wurden hier cDNA-Analysen, Western-Blot-Bestimmungen sowie mikroskopische Untersuchungen.

3.2.4.1 cDNA – Analysen

3.2.4.1.1 Pmel

Anlass für die Untersuchung früher Zeitpunkte war die Frage, ob sich ein fehlendes pFn schon in der ersten Zeit nach Ankunft der Tumorzellen im Gefäß negativ auf die Ansiedlung auswirkt. Um dies zu überprüfen, wurde die Expressionsstärke von Pmel in den Lungen von Kontroll- und pFn^{-/-}-Mäusen 2, 24 und 48 Stunden nach intravenöser Injektion von Tumorzellen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.59 dargestellt und zeigt, dass schon zwei Stunden nach Injektion das Signal in der Knockoutgruppe deutlich niedriger ist, was als weniger vitale Tumorzellen in den Lungen gewertet werden kann. Dieser Unterschied wird im Verlauf beibehalten und ist nach 48 Stunden hochsignifikant.

Dass sich im Gegenzug bei den pFn^{-/-}-Mäusen nicht vermehrt Tumorzellen in anderen Organen anheften können, wird in Abb. 3.60 dargestellt. In keinem der untersuchten Organe finden sich dafür Anzeichen im Sinne einer höheren Pmel-Expression.

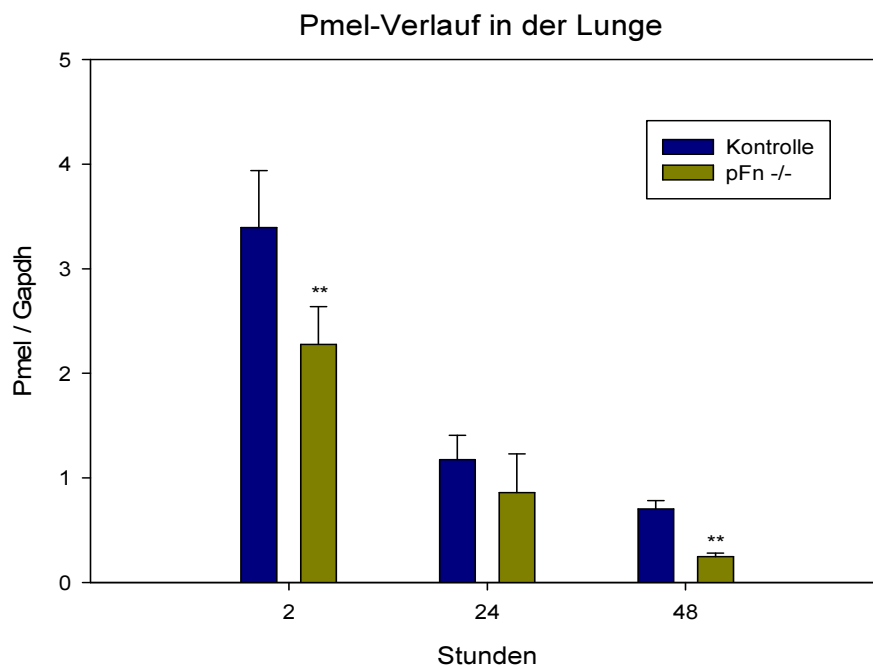


Abb. 3.59: Expressionsverhältnis von *Pmel/Gapdh* in der Lunge zu verschiedenen Zeitpunkten in Kontroll- und *pFn^{-/-}*-Gruppe. [n: 2 Stunden (3 *pFn^{-/-}*; 4 Ko.), 24 Stunden (4 *pFn^{-/-}*; 3 Ko.), 48 Stunden (7 *pFn^{-/-}*; 3 Ko.)].

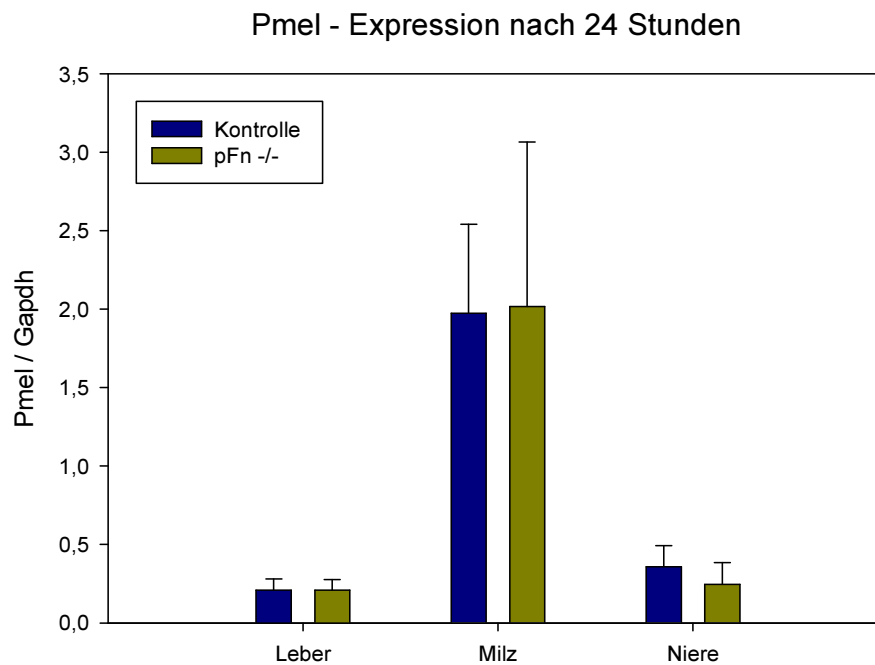


Abb. 3.60: Expressionsverhältnis von *Pmel/Gapdh* in verschiedenen Organen nach 24 Stunden. Bestimmung jeweils in Kontroll- (n=3) und *pFn^{-/-}*-Gruppe (n=4)

Aus den gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass die Ausschaltung von pFn zu einer reduzierten Ansiedlung von Tumorzellen in der Lunge, aber zu keinem vermehrten Auftreten von Tumorzellen in anderen Organen führt. Plasmatisches Fibronectin ist also in den ersten Tagen für die metastasierende Tumorzelle ein entscheidender Faktor.

Im Folgenden sollen nun mögliche Wirkungsweisen untersucht werden, mit denen pFn die Bildung einer metastatischen Nische beeinflussen kann. Dabei kommt unter anderem eine Veränderung der Immunantwort der Versuchstiere auf die ankommende Tumorzelle in Frage.

3.2.4.1.2 Marker unspezifischer Entzündung

Als Marker für eine unspezifische Entzündungsreaktion wurden hier die Expressionssignale von Crp, Ptx3, Tlr4 (Toll like receptor 4), iNos (inducible Nitric oxide synthase), Il-1 β (Interleukin 1 β) und Tnf α getestet. Die inflammatorischen Zytokine, wie Il-1 β und Tnf α , aktivieren dabei die Transkription von Genen wie zum Beispiel iNos. Das dadurch vermehrt in Makrophagen produzierte Enzym sorgt durch Bereitstellung von NO für deren zytotoxische Aktivität.¹⁵⁰ Crp und Ptx3 gehören beide zur Pentraxin-Superfamilie und werden ebenfalls im Rahmen einer unspezifischen Entzündung durch die Einwirkung von Zytokinen vermehrt produziert.¹⁵¹ Der Toll like receptor 4 hingegen ist primär für die Initiation einer Entzündungsreaktion verantwortlich. In Folge der ausgelösten Entzündungsvorgänge kommt es aber auch zu einer gesteigerten Transkription des Tlr4-Gens.¹⁵² Zusammenfassend würde ein hohes Signal bei den bestimmten Parametern auf eine verstärkt ablaufende Immunreaktion im untersuchten Organ deuten. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.61 dargestellt.

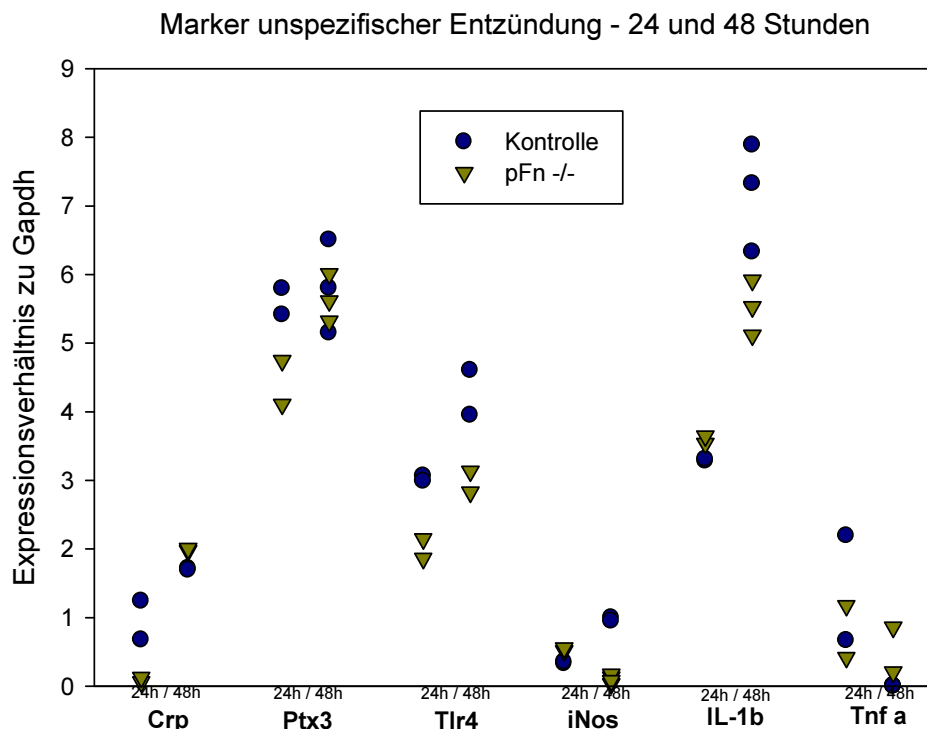


Abb. 3.61: Expressionsverhältnis der aufgeführten Gene jeweils zu Gapdh. Bestimmung in der Lunge nach 24 und 48 Stunden. (n=2-4; Doppelbestimmung)

In Bezug auf die Zytokine zeigt sich, dass das Signal für IL-1 β im Zeitverlauf in beiden Gruppen ansteigt, während es bei Tnf α zu einem Abfall des Signals kommt. Im ersten Fall zeigen sich höhere Werte in der Kontrollgruppe, im zweiten niedrigere. Damit kann keine eindeutige Tendenz zu verstärkter oder geringerer Expression von Zytokinen in einer der Versuchsgruppen festgestellt werden.

Die Messwerte für die weiteren untersuchten Gene steigen im Verlauf an, was darauf hindeutet, dass sich in Folge der Tumorzellansiedlung eine Entzündungsreaktion vor Ort entwickelt. Tendenziell zeigen sich jeweils in der Kontrollgruppe höhere Werte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass zu diesem Zeitpunkt in der Kontrollgruppe mehr aktivierte Makrophagen zu finden sind. Es lässt sich aber zusammenfassend feststellen, dass in Bezug auf unspezifische Entzündungsmarker keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestehen.

Unter der Annahme, dass in der Kontrollgruppe mehr Makrophagen in den Lungen zu finden sind, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich daneben auch Unterschiede in Bezug auf spezifische Abwehrzellen finden lassen.

3.2.4.1.3 Marker spezifischer Immunabwehr

Als Marker spezifischer Immunabwehr wurden die Expressionssignale von CD8a, Gzma, Gzmk und Prf1 in den Lungen nach 24 und 48 Stunden untersucht und ins Verhältnis zur Expression von Gapdh gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.62 dargestellt.

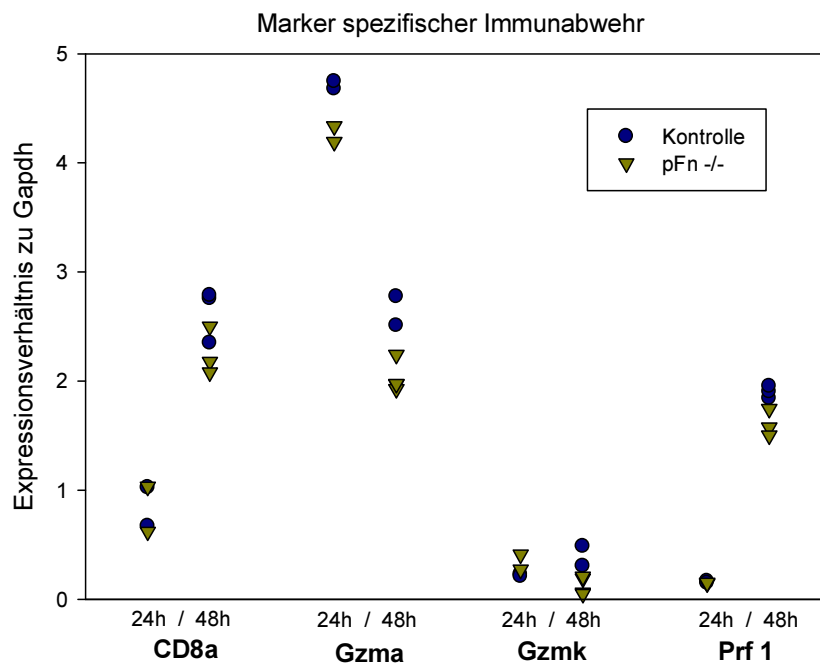


Abb. 3.62: Expressionsverhältnis der aufgeführten Gene jeweils zu Gapdh. Bestimmung in der Lunge nach 24 und 48 Stunden. (n=2-4; Doppelbestimmung)

In Bezug auf die spezifische Immunabwehr können quantitativ keine großen Abweichungen der pFn^{-/-}-Gruppe von der Kontrollgruppe beobachtet werden; jedoch ist festzuhalten, dass nach 48 Stunden die Werte von Gzma, Gzmk und Prf1 in den Knockoutmäusen alle niedriger liegen als in den Kontrollmäusen, was auf weniger zytotoxische Abwehrzellen vor Ort hindeutet.

Das erhöhte Signal für Immunzellen in der Kontrollgruppe könnte die Folge einer höheren Zahl absterbender Zellen sein, die durch apoptotische Signale Immunzellen anlocken. Um dies weiter zu untersuchen, wurde die cDNA der Lungen zusätzlich auf Expressionssignale für CD36 und Msr1 (Macrophage scavenger receptor 1) getestet, zwei Faktoren die für Erkennung und Abräumung apoptotischer Zellen durch Abwehrzellen zuständig sind. Aus Abb. 3.63 wird ersichtlich, dass die Signale der

Kontrollgruppe nach 48 Stunden über denen der pFn^{-/-}-Gruppe liegen. Die Ergebnisse deuten also darauf hin, dass in den Lungen mit pFn mehr apoptotische Zellen vorhanden sind.

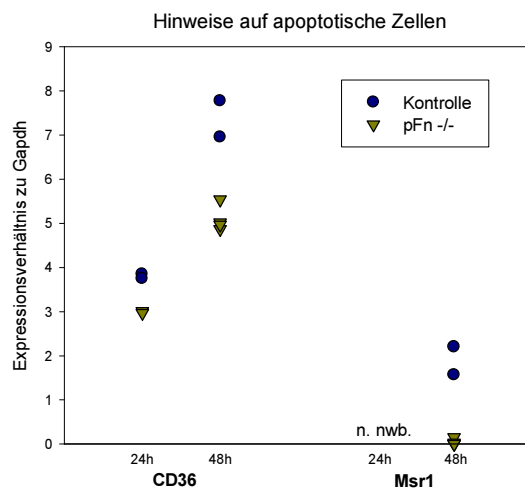


Abb. 3.63

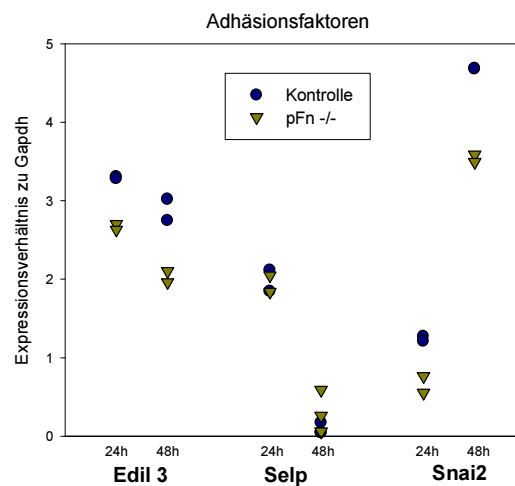


Abb. 3.64

Expressionsverhältnis der aufgeführten Gene jeweils zu Gapdh. Bestimmung in der Lunge nach 24 und 48 Stunden. (n=2-4; Doppelbestimmung)

3.2.4.1.4 Marker Nischen-assoziiierter Faktoren

Bei der Ausbildung einer metastatischen Nische spielen neben der Regulation der Immunantwort noch weitere Mechanismen eine Rolle, unter anderem die Adhäsion und Invasion der Tumorzellen. Ob die Anwesenheit von pFn hierbei eine Rolle spielt, wurde ebenfalls mit Hilfe von PCR-Analysen untersucht. Als Marker für Adhäsion kamen hier Selp, das adhäsionsfördernd ist, und Edil3, als Hinweis auf eine Abstoßung, in Frage. Die Expression beider Faktoren wurde in den Kontroll- und den Knockoutlungen nach 24 und 48 Stunden untersucht (Abb. 3.64). Hierbei ergab sich nach 48 Stunden bei den pFn^{-/-}-Mäusen eine im Vergleich zur Kontrolle verstärkte Bildung von Selp und eine geringere von Edil3.

Der Transkriptionsfaktor Snai2 wird in Zellen durch Anwesenheit von Tgf-β induziert, welches unter anderem aus aktivierten Plättchen stammen kann. Somit können durch die Expression von Snai2 Rückschlüsse auf die Menge an aktivierten Thrombozyten beziehungsweise die Freisetzung von Tgf-β in der Lunge gezogen werden. Die Messungen von Snai2 bei 48 Stunden ergeben in der Gruppe ohne pFn deutlich niedrigere Werte und liefern damit einen Hinweis auf eine geringere

Thrombozytenaktivierung in Abwesenheit von pFn. Dies bedeutet eine geringere Thrombusbildung um die Tumorzellen herum und damit eine beeinträchtigte Adhäsion.

Neben dem Einfluss auf die Adhäsion wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich Hinweise auf eine verbesserte Invasion von Tumorzellen durch die Anwesenheit von pFn finden lassen. Als Effektoren und damit als Marker einer Invasion kommt eine Vielzahl von Faktoren in Betracht, von denen hier wichtige Vertreter überprüft wurden. So zum Beispiel die Matrixmetalloproteinase 9, deren Expressionswert nach 24 Stunden in Abb. 3.65 dargestellt ist. Wie zu erkennen ist, sind keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen vorhanden. Ebenso verhält es sich bei dem Invasionsfaktor Angiogenin (Ang2). Ang2 kann über den Rezeptor Tie2 das Endothel lockern und so die Invasion erleichtern, jedoch zeigt sich durch die Ausschaltung von pFn keine Beeinflussung der Expression. Bei der Matrixmetalloproteinase 2 und bei Vimentin, ebenfalls beides Marker invadierender Tumorzellen, (Abb. 3.66) finden sich sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden höhere Expressionswerte in der Kontrollgruppe. Dies kann auf verbesserte Bedingungen für eine Tumorzellinvasion in Anwesenheit von pFn deuten.

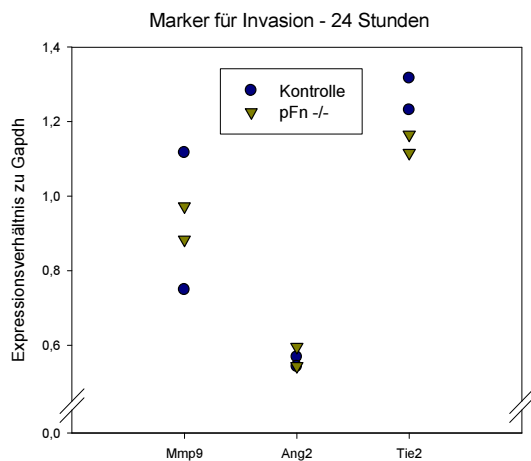


Abb. 3.65: Expressionsverhältnis der aufgeführten Gene jeweils zu Gapdh. Bestimmung in der Lunge nach 24 Stunden. (n=2; Doppelbestimmung)

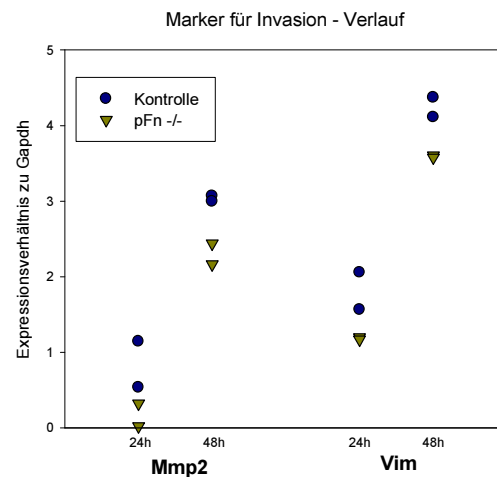


Abb. 3.66: Expressionsverhältnis der aufgeführten Gene jeweils zu Gapdh. Bestimmung in der Lunge nach 24 und 48 Stunden. (n=2; Doppelbestimmung)

Für die Bildung der metastatischen Nische wird in der Literatur diskutiert, dass VEGF-A aus dem Tumor zu einer Mobilisierung von Cxcr4/Kit-positiven hämatopoetischen

Stammzellen (HPCs) führt. Diese wandern aus dem Knochenmark in den Ort der metastatischen Nische ein und fördern dort die Tumorzellansiedlung. Dabei soll die Adhäsion der HPCs über Fibronectin vermittelt werden. Aus diesem Grund wurde hier untersucht, ob sich die Ausschaltung von pFn auf die beschriebenen Vorgänge auswirkt. Als Zeichen für die HPCs wurden die Expressionssignale von Cxcr4 und Kit verwendet. Cxcl12 wiederum ist ein Mediator, der für die Anlockung von CXCR4⁺-Knochenmarkszellen verantwortlich ist. Die Expression aller Parameter wurde in den Versuchsgruppen nach 24 und 48 Stunden bestimmt und in Relation zu Gapdh gesetzt (Abb. 3.67). Nach 24 Stunden zeigt die Kontrollgruppe in allen Parametern höhere Werte und damit Anzeichen für mehr unterstützende Knochenmarkszellen vor Ort. Im weiteren Verlauf steigen die Werte in allen Gruppen, wobei ein Unterschied zwischen Knockout und Kontrolle nach 48 Stunden bestehen bleibt. Es ergibt sich somit ein Hinweis darauf, dass in den Mäusen ohne pFn weniger HPCs mobilisiert werden.

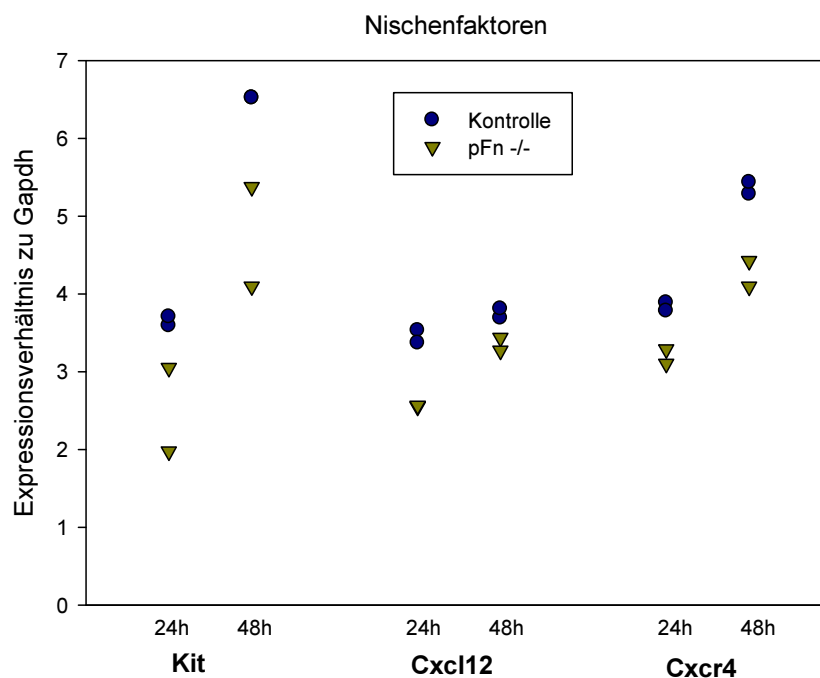


Abb. 3.67: Expressionsverhältnis der aufgeführten Gene jeweils zu Gapdh. Bestimmung in der Lunge nach 24 und 48. Stunden (n=2; Doppelbestimmung)

3.2.4.2 Proteinbestimmung in der Lunge

Alle in den vorherigen Kapiteln genannten Ergebnisse wurden durch Expressionsanalysen, die die vorhandene Menge einer bestimmten mRNA anzeigen, gewonnen. In den meisten Fällen kann von diesem Wert rückgeschlossen werden, in welcher Menge das entsprechende Protein lokal vorhanden ist. Je mehr mRNA existiert, desto mehr Protein wird gebildet und in die Umgebung abgegeben. Dieser Rückschluss gilt allerdings nicht mehr, wenn sich ein Protein vor Ort nur ansammelt, aber an einer ganz anderen Stelle produziert wurde. In solchen Fällen empfiehlt es sich, durch geeignete Messverfahren, wie Western Blot oder ELISA, eine direkte Bestimmung der Proteinmenge durchzuführen.

Es wurde bereits gezeigt, dass es in der Lunge nach intravenöser Tumorzellinjektion zu einer starken Ansammlung von Fibronectin kommt (Abb. 3.47). Unklar blieb dabei, woher das Fibronectin stammt. Zur weiteren Abklärung wurden 24 Stunden nach Injektion der Tumorzellen die Lungen aus Kontroll- und Knockoutmäusen entnommen und in den entsprechenden Lysaten die Fibronectinmenge bestimmt. Das Auswertungsbild des Western Blot ist in Abb. 3.68 dargestellt, pFn^{-/-}-Mäuse sind in den Linien 2, 4, 6 und 7 aufgetragen. Eindeutig zeigt sich hier, dass es ausschließlich in den Kontrollmäusen zur massiven Ansammlung von Fibronectin kommt, wodurch bewiesen ist, dass es sich bei dem angesammelten Fibronectin um plasmatisches Fibronectin handelt.

Fibronectin hat neben vielen anderen Funktionen auch Bindungsstellen für VEGF-A. Es wurde deshalb untersucht, ob sich die Ausschaltung von pFn, und die damit einhergehende geringere Ansammlung von Fibronectin in der Lunge, auch in einer geringeren lokalen Menge an VEGF-A auswirkt. Um diese zu bestimmen wurden 24 Stunden nach Injektion der Tumorzellen die Werte von VEGF-A in der Lunge mittels ELISA gemessen und zwischen den beiden Gruppen mit und ohne pFn verglichen. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Abb. 3.69 dargestellt. Durch den Knockout von pFn kommt es im Anschluss an eine Tumorzellinjektion zu keiner Veränderung der VEGF-A-Konzentration in der Lunge.

Fibronectin in der Lunge

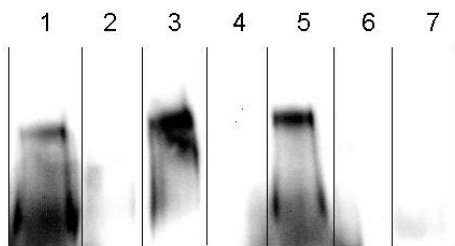


Abb. 3.68: WB; Bestimmung von Fibronectin in Lungenlysaten 24 Stunden nach Tumorzellinjektion

pFn^{-/-}-Gruppe: Line 2, 4, 6 und 7;
Kontrollgruppe: Line 1, 3 und 5

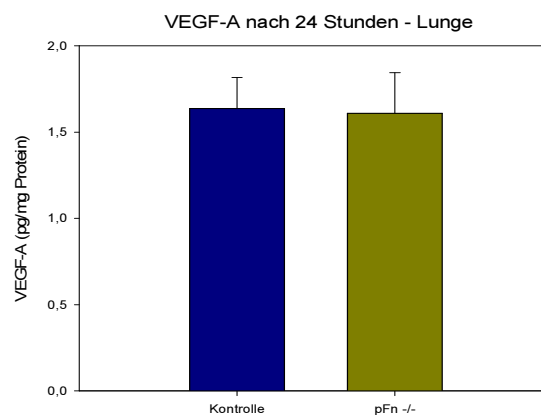


Abb. 3.69: ELISA; mittlere VEGF-A-Konzentration in Lungenlysaten 24 Stunden nach Tumorzellinjektion. Bestimmung in Kontroll- (n=3) und pFn^{-/-}-Gruppe (n=4). Jeweils Doppelbestimmung.

Neben der Analyse des RNA-Expressionsprofils und der Proteinmengen besteht eine weitere Möglichkeit, eine Vorstellung über die Situation einer metastasierenden Tumorzelle vor Ort zu gewinnen, in der mikroskopischen Betrachtung von Mikrometerschnitten der Lungen.

3.2.4.3 Mikroskopische Analysen

Die Analyse der Pmel-Expression hat gezeigt, dass schon früh nach der Injektion weniger Tumorzellen in den Lungen vorhanden sind, wenn pFn ausgeschaltet wird. Die mikroskopische Auswertung von Lungenschnitten zu diesen Zeitpunkten kann weitere Informationen darüber liefern, inwiefern sich der Knockout von pFn auswirkt. Dafür wurden vier Kontroll- und fünf Knockoutmäusen jeweils $2 \cdot 10^5$ mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte D5-Melanomzellen in eine Schwanzvene injiziert. Nach 2 beziehungsweise 24 Stunden wurden jeweils zwei Kontrollmäuse und zwei respektive drei Knockoutmäuse getötet. Die Lungen der Tiere wurden konserviert und für die Färbungen weiterverwendet. In den Abb. 3.70 bis Abb. 3.75 sind Lungenschnitte von Mäusen, die zwei Stunden nach Injektion getötet wurden, gezeigt; in der linken Spalte die Bilder der Kontrollgruppe, in der rechten Spalte die der pFn^{-/-}-Gruppe. Die gleiche Anordnung findet sich für die Lungenschnitte 24 Stunden nach Injektion in den Abb. 3.76 bis Abb. 3.81. Tumorzellen leuchten auf Grund ihrer Markierung rot, Fibronectin wird durch Antikörperbindung grün angezeigt und die Hoechst-Färbung sorgt für eine blaue Darstellung von Zellkernen.

2 Stunden nach Tumorzellinjektion

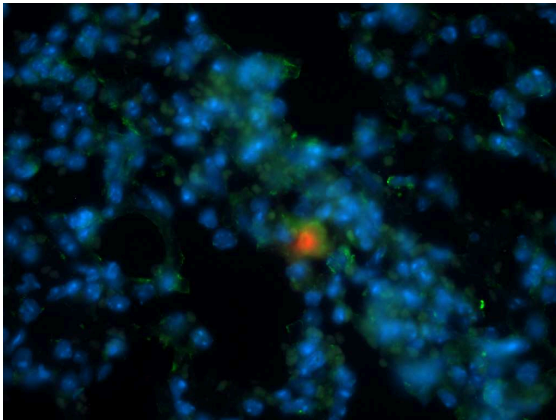


Abb. 3.70. Kontrolle, 40x

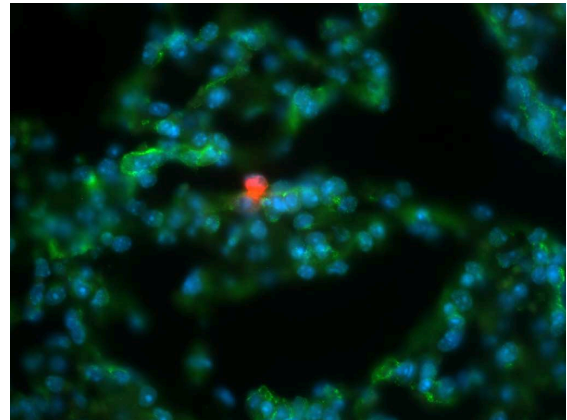


Abb. 3.71. $pFn^{-/-}$, 40x

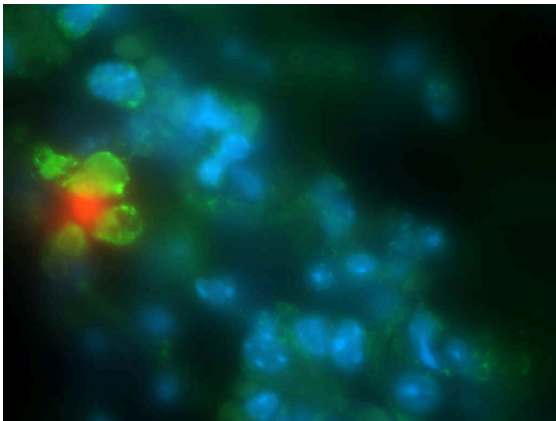


Abb. 3.72. Kontrolle, 100x

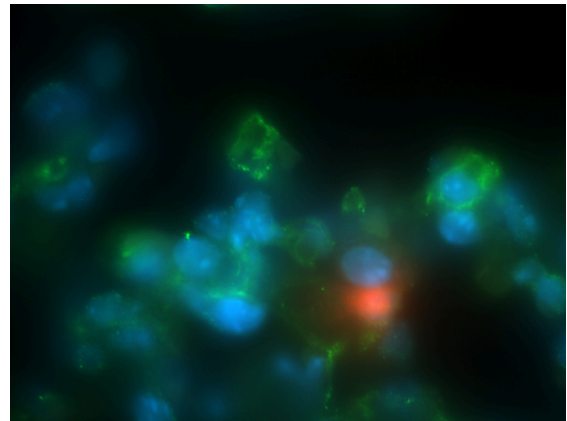


Abb. 3.73. $pFn^{-/-}$, 100x

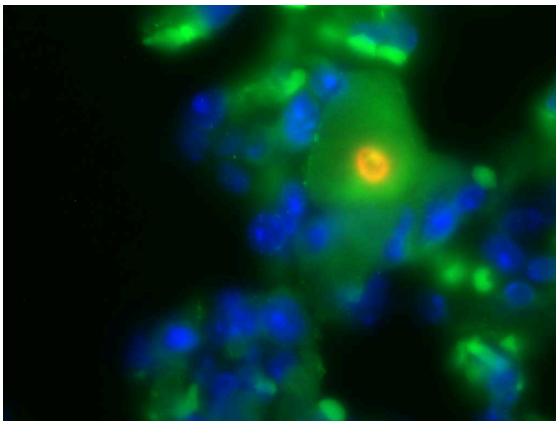


Abb. 3.74. Kontrolle, 100x

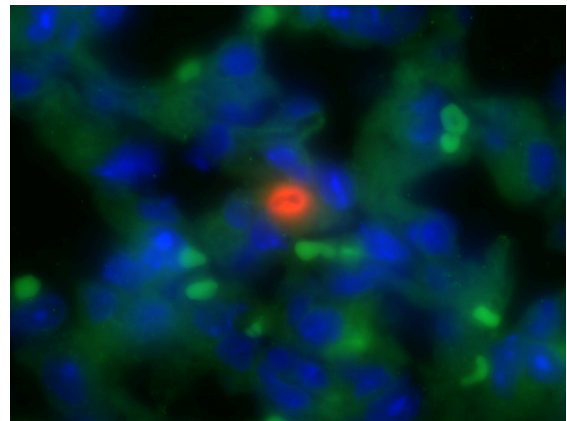


Abb. 3.75. $pFn^{-/-}$, 100x

Abb. 3.70 - Abb. 3.75: Histochemische Anfärbungen von Lungenanschnitten 2 Stunden nach Tumorzellinjektion. Linke Spalte: Kontrolle; rechte Spalte: $pFn^{-/-}$. Rot: Melanomzellen; grün: Fibronectin; blau: Zellkerne. Vergrößerung 40x bzw. 100x.

24 Stunden nach Tumorzellinjektion

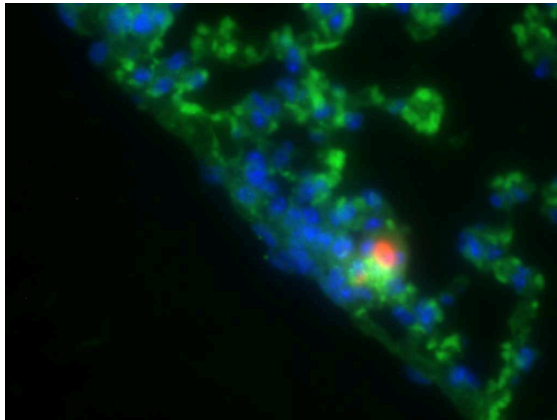


Abb. 3.76. Kontrolle, 40x

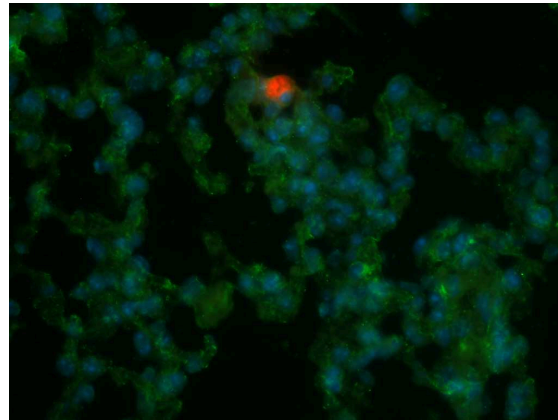


Abb. 3.77. $pFn^{-/-}$, 40x

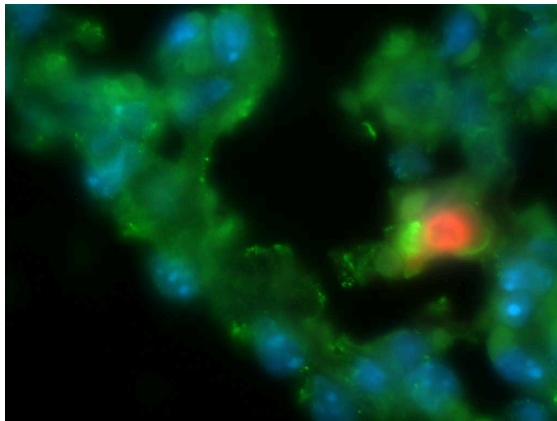


Abb. 3.78. Kontrolle, 100x

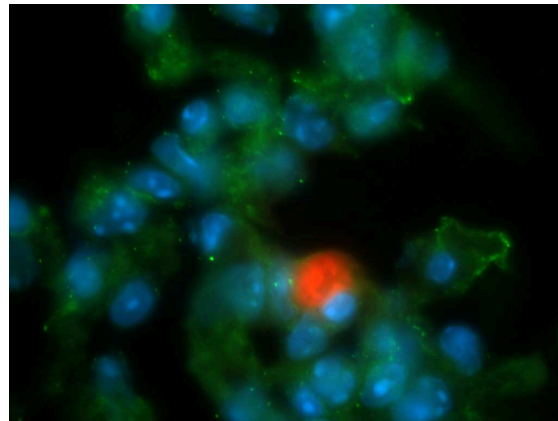


Abb. 3.79. $pFn^{-/-}$, 100x

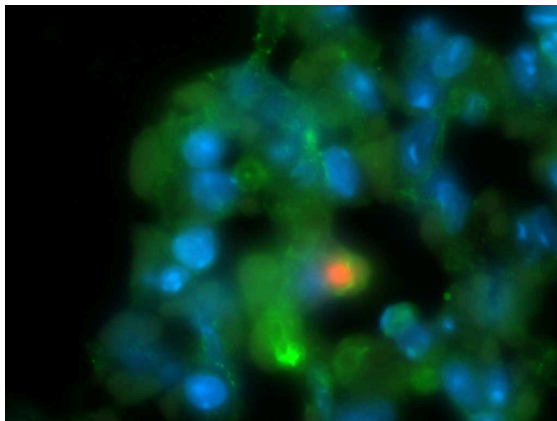


Abb. 3.80. Kontrolle, 100x

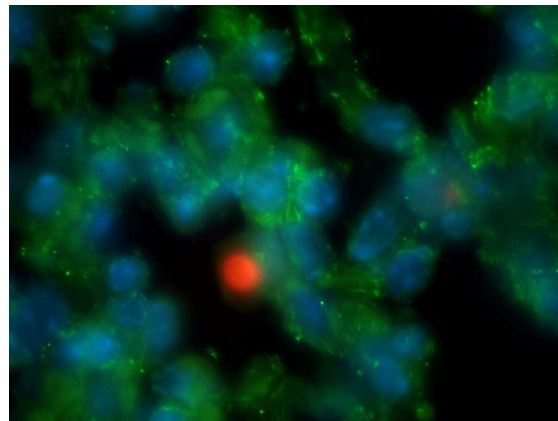


Abb. 3.81. $pFn^{-/-}$, 100x

Abb. 3.76 - Abb. 3.81: Histochemische Anfärbungen von Lungenanschnitten 2 Stunden nach Tumorzellinjektion. Linke Spalte: Kontrolle; rechte Spalte: $pFn^{-/-}$. Rot: Melanomzellen; grün: Fibronectin; blau: Zellkerne. Vergrößerung 40x bzw. 100x.

An Unterschieden zwischen den beiden Versuchsgruppen ist festzustellen, dass die Tumorzellen in den Kontrollmäusen in deutlich höherem Ausmaß von Fibronectin umgeben werden, als in den Knockoutmäusen. Zudem zeigt sich, dass sich an die einzelnen Tumorzellen in den Kontrollmäusen noch andere – offenbar kernlose – Zellen von außen anlagern, was in der Situation ohne pFn nicht beobachtet werden kann. Ob sich die Anwesenheit von pFn zusätzlich auch in einer veränderten Extravasation der Tumorzellen ins Lungengewebe auswirkt, ist an Hand der Schnitte nicht zu beurteilen, da die einzelnen Lungengefäße nicht klar zu erkennen sind. Dennoch liefern die mikroskopischen Bilder mit dem Nachweis, dass sich pFn um die Tumorzelle im Gefäß ansammelt eine wichtige Information. Die Frage ist, ob pFn dabei die Tumorzelle nur umgibt, oder sogar direkt an diese binden kann. Das kann in-vitro durch FACS-Analyse untersucht werden.

3.2.5 FACS-Analyse zur Bindung von pFn an D5 - Melanomzellen

Die in den vorangegangenen Versuchen verwendete Tumorzelllinie wurde auf ihre Fähigkeit, pFn zu binden, untersucht. Dazu wurden $2 \cdot 10^5$ Tumorzellen in Blutplasma aus Mäusen resuspendiert, in dem pFn enthalten war. Zur Kontrolle wurden in einem zweiten Ansatz Tumorzellen in PBS gegeben. Anschließend wurden beide Suspensionen mit einem FITC-markierten Fibronectinantikörper inkubiert und in der Durchflusszytometrie auf ein FITC-Signal untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.82 dargestellt.

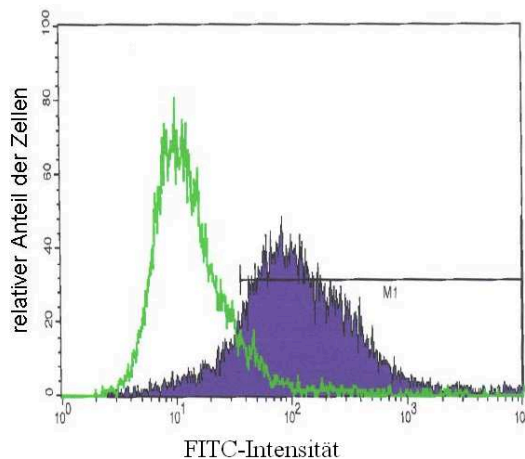


Abb. 3.82: FACS; FITC-Signalintensität der D5-Melanomzellen nach Zugabe eines FITC-markierten Fn-Antikörpers und Inkubation mit entweder PBS (grüne Kurve) oder Plasma (lila Kurve).

Auf der x-Achse ist die Intensität des FITC-Signals in logarithmischer Skala, auf der y-Achse der relative Anteil der mit dieser Intensität gemessenen Zellen in Prozent aufgetragen. Die grüne Kurve zeigt die Messungen der Tumorzellen ohne Zugabe von Serum, die lila Kurve die Tumorzellen mit Zugang zu pFn. M1 beschreibt den Messbereich in dem davon ausgegangen wird, dass die gemessene Intensität für eine spezifische Bindung des 1. und des 2. Antikörpers spricht. Werte jenseits davon werden als unspezifisches „Hintergrundrauschen“ eingestuft. Durch die Zugabe von Mäuseserum werden mehr als 80 % der gemessenen Tumorzellen durch den Fn-Antikörper erkannt, was bedeutet, dass die Tumorzellen in der Tat zu einem Großteil dazu in der Lage sind, pFn zu binden.

Um die Bedeutung von Fibronectin bei der Bildung einer Metastase zu klären, wurde in diesem Kapitel eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt. Es konnte hierbei unter anderem gezeigt werden, dass sich plasmatisches Fibronectin nach intravenöser Tumorzellinjektion vermehrt in der Lunge ansammelt. Dieses wird von den Tumorzellen gebunden und unterstützt über eine verbesserte Adhäsion das lokale Überleben. Dementsprechend kommt es nach Ausschaltung von pFn zu einer drastischen Reduktion der Metastasierung.

Zur besseren Beurteilung des in dieser Arbeit angewandten Versuchsmodells wurde ein Genexpressionsarray der verwendeten Melanomzellen durchgeführt. Hierdurch wurden Informationen darüber gewonnen, welche Gene exprimiert und welche Proteine somit von den Tumorzellen selbst gebildet werden.

3.3 Expressionsarray der D5-Melanomzellen

Die Ergebnisse des Genexpressionsarrays sind in Tab. 3-1 dargestellt. Dabei wurden nur Gene berücksichtigt, die in dieser Arbeit von Bedeutung sind. In der ersten Spalte steht das Namenskürzel des untersuchten Gens, in der zweiten der Mittelwert aus drei einzelnen Messungen und in der dritten, ob die Expression damit als vorhanden (j) oder nicht vorhanden (n) betrachtet wird.

Tab. 3-1 Genexpressionsarray der D5-Melanomzellen

Name*	Mittelwert	vorhanden	Name*	Mittelwert	vorhanden
Cxcr4	135,95	j	Mmp2	161,83	j
Itga1	114,25	n	Mmp3	125,02	j
Itga2	78,32	n	Mmp7	77,36	n
Itga2b	97,88	n	Mmp8	81,76	n
Itga3	98,09	n	Mmp9	105,49	n
Itga4	93,89	n	Mmp10	122,24	j
Itga5	95,05	n	Mmp11	98,68	n
Itga6	162,44	j	Mmp12	80,56	n
Itga7	72,04	n	Mmp13	103,99	n
Itga8	92,33	n	Mmp15	87,23	n
Itga9	88,65	n	Mmp16	131,79	j
Itga10	151,02	j	Mmp17	125,14	n
Itga11	92,41	n	Mmp19	82,9	n

Tab. 3-1 Genexpressionsarray der D5-Melanomzellen

Name*	Mittelwert	vorhanden	Name*	Mittelwert	vorhanden
Itgae	78,53	n	Mmp20	104,33	n
Itgal	101,34	n	Mmp21	73,32	n
Itgam	72,53	n	Mmp24	355,9	j
Itgav	175,56	j	Mmp28	94,4	n
Itgax	89,71	n	Nrp1	197,43	j
Itgb1	4725,22	j	Nrp2	89,46	n
Itgb2	77,44	n	Pgf	118,03	n
Itgb3	90,57	n	Plau	116,9	j
Itgb5	720,84	j	Plaur	152,87	j
Itgb6	84,87	n	Vegfa	1465,17	j
Itgb7	113,68	n	Vegfb	1011,84	j
Itgb8	82,31	n	Vegfc	324,29	j
Lox	78,33	n	Vegfr1	97,79	n
Mmp1a	71,38	n	Vegfr2	87,82	n
Mmp1b	81,55	n	Vegfr3	79,74	n

Tab. 3-1: Auswahl der im Expressionsarray getesteten Gene. Gezeigt ist der Mittelwert dreier Messungen. Produkte der **fett** gedruckten Gene werden als vorhanden angenommen.

*) Vollständige Namen der Gene siehe Anhang

Nach Darstellung aller für diese Arbeit gewonnenen Ergebnisse, sollen diese im nächsten Abschnitt im Gesamtkontext der Metastasenbildung diskutiert werden.

4 Diskussion

Die Bildung von Metastasen stellt heutzutage das Hauptproblem einer Krebserkrankung dar; immerhin ist der Großteil aller krebsbedingten Todesfälle auf Metastasenbildung zurückzuführen. In der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten ist in letzter Zeit die Blockade der Angiogenesefaktoren VEGF-A und PlGF stark in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit gerückt. Das Ziel ist es, das Entstehen neuer Blutgefäße als Voraussetzung für das Wachstum von Tumoren zu unterbinden. Dabei wurde bisher kaum beachtet, dass diese Wachstumsfaktoren auch schon in früheren Phasen der Metastasierung, also noch vor dem Notwendigwerden einer Angiogenese, in relevanter Menge von den Tumorzellen produziert werden und sich schon zu diesem Zeitpunkt auf den Verlauf der Metastasierung auswirken können. Die Frage stellt sich also, ob eine Blockade der Angiogenesefaktoren nicht auch schon gegen Tumorzellen eingesetzt werden sollte, die sich noch im Blutgefäß befinden. Um diese Situation in einer Versuchsanordnung simulieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit vornehmlich ein Modell verwendet, das den Ablauf der Metastasierung durch zwei Vorgaben einschränkt: einerseits wird durch die direkte Injektion von Tumorzellen in die Blutbahn das Problem einer möglichen Beeinflussung der Ergebnisse durch einen Primärtumor umgangen. Andererseits sorgt die Begrenzung der Versuchsdauer auf wenige Tage dafür, dass die sich entwickelnde Metastase auf eine Größe beschränkt bleibt, die noch keine Angiogenese notwendig werden lässt. Somit kann das Verhalten der ankommenden Tumorzellen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen exakt betrachtet werden und geklärt werden, welche Rolle die VEGF-A-Sekretion der Tumorzellen während dieser Phase der hämatogenen Metastasierung spielt.

4.1 Von Tumorzellen produziertes VEGF-A unterstützt die Metastasenbildung

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welche Rolle VEGF-A für die Ansiedlung von im Blutstrom befindlichen Tumorzellen spielt. Dazu wurde ein Tumormodell entwickelt, bei dem D5-Melanomzellen intravenös in C57/Bl6-Mäuse injiziert wurden. Dies führt nach 12 Tagen zu gut sichtbaren Lungenmetastasen, deren

Größe und Anzahl als Kriterium für das Ausmaß der Tumorzellansiedlung unter der jeweiligen Versuchsbedingung ausgewertet wurden.

Mit Hilfe des beschriebenen Modells wurde hier gezeigt, dass die Plasmakonzentration von VEGF-A circa fünf Tage nach Tumorzellinjektion steil ansteigt. Dieser Anstieg korreliert sehr gut mit der Anzahl vitaler Melanomzellen in der Lunge, ausgedrückt durch Pmel-Expression, wo sich ebenfalls nach fünf Tagen eine deutliche Zunahme zeigt. Das heißt, die vermehrte VEGF-A-Produktion geht von den angesiedelten Tumorzellen aus. Daraus lässt sich im Umkehrschluss die Hypothese ableiten, dass sich insbesondere diejenigen Tumorzellen ansiedeln können, die VEGF-A produzieren, dass also die VEGF-A-Produktion die Ansiedlung unterstützt.

Um dies zu überprüfen wurden Tumorzellen mit siRNA gegen VEGF-A transfiziert und in einem Metastasenversuch mit scheinbehandelten Tumorzellen verglichen. Aus den Experimenten mit siRNA geht hervor, dass Tumorzellen, die kein VEGF-A produzieren, nach iv-Injektion signifikant weniger Metastasen in der Lunge ausbilden als Tumorzellen ohne diese Einschränkung. Damit steht auch fest, dass VEGF-A der Tumorzelle dabei hilft, sich lokal anzusiedeln und zu überleben.

Von diesem Befund ausgehend wurde in den nächsten Schritten untersucht, mit welchen Mechanismen VEGF-A die Metastasierung unterstützen kann. Dazu kann prinzipiell unterschieden werden, ob sich VEGF-A auf die Tumorzellen selber, oder auf deren lokale Umgebung auswirkt. Zunächst soll es um die erste Möglichkeit gehen. Aus der Literatur ist bekannt, dass VEGF-A bestimmten Tumorzellen als Proliferationssignal dient. So wurden in-vitro und in-vivo nach Transfektion mit siRNA/VEGF-A mehr apoptotische Tumorzellen beobachtet, als in einer unbehandelten Kontrollgruppe.^{153, 154} In einem Injektionsmodell ergaben sich bei den transfizierten Zellen auch Hinweise auf weniger Metastasen,¹⁵⁵ was wohl auf die schon in-vitro geringere Proliferation der Tumorzellen zurückzuführen ist. Ursächlich für diese Wirkung von VEGF-A wird eine Autostimulation der Tumorzellen über VEGF-Rezeptoren vermutet. Dass dieser autokrine Mechanismus bei den eigenen Experimenten allerdings keine Rolle spielt, belegen zwei Befunde. Zum Einen zeigen die hier verwendeten D5-Melanomzellen im Genexpressionsarray kein Signal für einen VEGF-Rezeptor und zweitens sind zwischen den verwendeten Tumorzellen mit und ohne siRNA in-vitro keine Differenzen in Bezug

auf Vitalität und Proliferation zu beobachten. Eine direkte Einflussnahme von VEGF-A auf die Tumorzellen kann in dem verwendeten Tumormodell also ausgeschlossen werden.

Damit kommen für die VEGF-A-Wirkung nur Effekte in Frage, die VEGF-A auf die Umgebung der Tumorzellen ausübt. Wichtig ist in diesem Zusammenhang zu bedenken, zu welchem Zeitpunkt VEGF-A damit beginnt, zu wirken. Für die Auszählungen der Metastasen wurden die Versuchsmäuse am Tag 12 nach Tumorzellinjektion getötet und untersucht. VEGF-A wird aber von Anfang an – das heißt direkt nach der Injektion – von den Tumorzellen produziert und damit auch schon ab dem Zeitpunkt der Ankunft in der Lungenstrombahn auf die Umgebung einwirken. Deshalb wurden in dieser Arbeit zusätzlich frühe Zeitpunkte, 2 24 und 48 Stunden nach Injektion, mit Hilfe von RNA-Expressionsanalysen untersucht.

Hierbei stellt sich zuerst die Frage, ob bereits zu diesen frühen Zeitpunkten eine Reduktion der vitalen Tumorzellen in der Lunge durch die Blockade von VEGF-A festzustellen ist. Dies wurde durch Auswertung des von den Tumorzellen ständig exprimierten Gens Pmel untersucht. In der Tat ergaben die Messungen in der siRNA-Gruppe, der Gruppe ohne VEGF-A-Produktion, nach 48 Stunden im Vergleich durchgängig niedrigere Werte. Das liefert einen Hinweis darauf, dass das Fehlen von VEGF-A schon in den ersten Tagen zu einem geringeren Überleben der Tumorzellen führt, im Umkehrschluss also, dass VEGF-A die Ansiedlung metastasierender Tumorzellen unterstützt.

Nachdem gezeigt wurde, dass Tumorzellen, die kein VEGF-A produzieren, eine geringere Metastasierungsrate haben und dass sich das Fehlen von VEGF-A wohl schon in den ersten Tagen auf das Überleben der Tumorzellen auswirkt, stellt sich im nächsten Schritt die Frage auf welche Weise dies geschieht, beziehungsweise welche Mechanismen für diese Wirkung verantwortlich sind. Es kommen verschiedene Wirkungsmöglichkeiten von VEGF-A in Betracht, welche im Folgenden diskutiert werden sollen.

Neben der Bedeutung für die Angiogenese konnte für VEGF-A auch eine Rolle bei der Tumor-induzierten Immunsuppression nachgewiesen werden.¹⁵⁶ Unter anderem verhindert VEGF-A der Tumorzellen die Ausreifung von Dendritischen Zellen, welche

im unreifen Zustand wiederum die Aktivität von CD8⁺-T-Zellen einschränken.^{97, 157} Dadurch kann den Tumorzellen das Überleben erleichtert werden. Damit übereinstimmend konnten hier in Expressionsanalysen Hinweise gefunden werden, dass sich 48 Stunden nach Injektion in den Lungen der Kontrollgruppe weniger CD8⁺-Zellen und auch weniger sonstige Hinweise auf spezifische Abwehr (Prf1) finden lassen als in der siRNA-Gruppe ohne VEGF-A-Produktion. Das liefert eine erste Erklärung, auf welche Weise VEGF-A die Ansiedlung von Tumorzellen begünstigen kann, nämlich durch die Einflussnahme auf die spezifische Immunantwort, die sich in einer geringeren Zahl CD8⁺-T-Zellen in der Lunge auswirkt.

Bei der Untersuchung unspezifischer Entzündungsmarker liefert Ptx3 ein interessantes Ergebnis. Das Ptx3-Protein wird von Endothelzellen und Fibroblasten auf einen Entzündungsstimulus hin produziert und unterstützt anschließend die Phagozytierung apoptotischer Zellen.¹⁵⁸ In einem Mausmodell mit induzierter Ischämie konnte nachgewiesen werden, dass es in ischämischen Gebieten insbesondere dann zu einem Anstieg der Expression von Ptx3 kommt, wenn die Ischämie aufgehoben wird und eine Reperfusion erfolgt.¹⁵⁹ Auch die ankommenden Tumorzellen in dem in dieser Arbeit verwendeten Metastasenmodell führen zu einer Ischämie durch den Verschluss von Blutkapillaren. Durch Entfernung der Tumorzellen aus dem Gefäßbett, mechanisch oder durch das Immunsystem, kommt es dann zur Reperfusion. In den Messungen der Ptx3-Expression zeigt sich hier, dass in der Kontrollgruppe erst nach 48 Stunden ein Signal erscheint, während in der siRNA-Gruppe schon früher ein Anstieg der Ptx3-Produktion vorhanden ist. Da Ptx3 nach Reperfusion exprimiert wird, erhält man mit diesen Ergebnissen einen Hinweis darauf, dass Tumorzellen ohne eigene VEGF-A-Sekretion schneller und effektiver aus dem Gefäßbett entfernt werden, wodurch es früher zur Reperfusion kommen kann. Es lässt sich also ableiten, dass Tumorzellen ohne VEGF-A-Produktion weniger wirksam eine Bindung an das Endothel oder das dahinterliegende Lungengewebe eingehen können und damit eine schlechtere Adhäsion zeigen.

Auf welche Weise kann aber VEGF-A die Adhäsion einer Tumorzelle, die sich im Blutgefäß mit Kontakt zum Endothel befindet, beeinflussen? Das Endothel stellt primär ein Hindernis für die Tumorzelle dar, das es zu überwinden gilt. Über VEGF-A ist

bekannt, dass es dazu in der Lage ist, Lücken in der Endothelzellschicht zu schaffen,⁸⁹ wodurch den Tumorzellen Kontakt zu Bestandteilen der EZM gewährt wird. Hinzu kommt, dass tumorzelleigenes VEGF-A wohl durch Autostimulation über VEGF-Rezeptoren auf den Tumorzellen auch die Bindung zu Bestandteilen der EZM unterstützen kann, was aus in-vitro-Versuchen hervorgeht.¹⁵⁵ Der Ablauf der Extravasation lässt sich damit als eine Abfolge von einzelnen Schritten beschreiben. Die Tumorzelle bleibt im Gefäßbett mit Kontakt zum Endothel stecken. Daraufhin kann die lokal hohe Konzentration an VEGF-A, welches von der Tumorzelle produziert wird, Lücken in der Endothelschicht schaffen und so die EZM freilegen. Zu dieser kann die Tumorzelle, wiederum unterstützt durch VEGF-A-Wirkung, über Rezeptoren eine feste Verbindung eingehen, was das lokale Überleben und die spätere Invasion erleichtert. Dementsprechend bleibt eine Tumorzelle ohne VEGF-A-Sekretion länger ungebunden im Gefäß und kann somit leichter durch Immunzellen oder mechanische Kräfte des Blutstroms angegriffen und entfernt werden. Dieses Modell liefert eine Erklärung für die geringere Metastasierung, wie sie in den Versuchen nach Ausschaltung einer VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen gesehen wurde.

Neben den oben genannten Einflüssen stehen noch weitere Faktoren im Verdacht, VEGF-A-abhängig an der Ausbildung einer metastatischen Nische beteiligt zu sein. Große Bedeutung wird dabei von manchen Arbeitsgruppen der MMP9 zugemessen.^{58, 60} Es konnte aus entsprechenden Experimenten abgeleitet werden, dass von Tumorzellen produziertes VEGF-A zu einer MMP9-Produktion in VEGFR1⁺-Endothelzellen und Makrophagen führt, wodurch es unter anderem zur Degradation der Basalmembran und somit zu einer erleichterten Adhäsion und Emigration der Tumorzellen kommt. Dementsprechend müsste eine Ausschaltung der VEGF-A-Produktion eine geringere Expression von Mmp9 zur Folge haben. Dies allerdings lässt sich durch die eigenen Messungen nicht bestätigen, da sich Kontroll- und siRNA-Gruppe beim Verlauf der Expressionskurven kaum unterscheiden. Aber vor dem Hintergrund einer möglichen „Ersatzaktivierung“ des VEGFR1 durch PlGF, worauf später noch eingegangen werden wird, kann hier nur festgehalten werden, dass VEGF-A nicht alleine für eine Steigerung der Mmp9-Expression verantwortlich sein kann.

Ein weiterer für die Ansiedlung von Tumorzellen wichtiger Mechanismus ist die Funktion der sogenannten Cxcl12-Cxcr4-Achse. Es wird angenommen, dass sekretiertes CXCL12 chemotaktisch auf CXCR4⁺-Tumorzellen wirkt, eventuell ein Überlebenssignal an die Zelle übermitteln kann und so die Ansiedlung in der Lunge unterstützt.^{160, 161} In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass es durch eine gegen VEGF-A gerichtete Therapie zu einer Hochregulation von Cxcr4 in den Tumorzellen kommt.¹⁶² Das bedeutet, dass die Funktion der Cxcl12-Cxcr4-Achse von VEGF-A beeinflusst werden kann. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit überprüft, ob sich die Blockade der VEGF-A-Sekretion in den Tumorzellen auswirkt. Die Charakterisierung der verwendeten D5-Melanomzellen mit Hilfe von Genarrays zeigt eine geringe Expression von Cxcr4, doch auf Grund der beschriebenen Hochregulierung wurde Cxcr4 auch in-vivo bestimmt. In den Expressionsanalysen zu Cxcr4 in der Lunge verlaufen die Werte der siRNA-Gruppe tatsächlich in den ersten 48 Stunden oberhalb der Kontrollgruppe. Daraus müsste sich folgerichtig ein Überlebensvorteil für die siRNA-Tumorzellen ableiten lassen, allerdings ist die Differenz nur gering. Zudem ist nicht sicher, dass das Cxcr4-Signal von den Tumorzellen ausgeht. Cxcr4 wird von einer Vielzahl von Zellen, neben hämatopoetische Zellen unter anderem auch Makrophagen, Neutrophile, Endothelien und Epithelien, exprimiert¹⁶¹ und so lässt sich aus der Messung von Cxcr4 keine konkrete Aussage über die Wirkungsweise von VEGF-A ableiten.

Neben der eben beschriebenen Cxcl12-Cxcr4-Achse finden sich in der Literatur noch weitere Gene, deren Expression mit einem Metastasierungsvorteil für Tumorzellen in Verbindung gebracht wird. Zwei Faktoren, für die das zutrifft sind Lox und Plau.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Für beide konnte gezeigt werden, dass sie durch enzymatische Umgestaltung von Bestandteilen der EZM, insbesondere Kollagen, die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen erhöhen können. Es wurde hier untersucht, ob in Abhängigkeit von VEGF-A Unterschiede in der Expression der beiden Faktoren auftreten. In beiden Fällen finden sich zwar in der Kontrollgruppe schon nach zwei Stunden höhere Werte, doch anschließend sind keine Unterschiede mehr zur siRNA-Gruppe erkennbar. Welche Auswirkung diese früh erhöhten Werte haben ist nicht sicher zu beurteilen, doch aufgrund der folgenden Normalisierung nach 24 Stunden kann davon ausgegangen werden, dass sowohl Plau als auch Lox durch die Blockade der VEGF-A-Produktion in

den Tumorzellen nicht nachhaltig beeinflusst werden, dass VEGF-A also seine Metastasen-fördernde Wirkung nicht über diese Faktoren erreicht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich nach Ausschaltung der VEGF-A-Produktion weniger Tumorzellen in der Lunge ansiedeln. Dabei scheint insbesondere die Adhäsion an subendotheliale Schichten beeinträchtigt zu sein. Unter der Annahme, dass die Tumorzellen ohne VEGF-A schlechter haften bleiben, ergibt sich folgerichtig die Möglichkeit, weiter zu zirkulieren und sich in der Folge an einer anderen Stelle anzusiedeln. Dementsprechend wurde hier untersucht, ob es in der siRNA-Gruppe in anderen Organen, in diesem Fall Milz und Leber, zu einem vermehrten Auftreten von Tumorzellen kommt. Tatsächlich findet sich in der Milz nach 48 Stunden ein gegenüber der Kontrollgruppe gering erhöhte Pmel-Werte. In der Leber hingegen finden sich keinerlei Anzeichen vermehrter Tumorzellen; sie scheint aber im Gegensatz zur Milz generell ungeeigneter für eine Ansiedlung zu sein, was sich aus der durchweg niedrigeren Signalthöhe der Pmel-Expression in allen Gruppen ablesen lässt. In der Milz kommt es im Zeitverlauf in Versuchs- und Kontrollgruppe zu einem Anstieg des Pmel-Signals. Dabei deuten die höheren Werte der siRNA-Gruppe daraufhin, dass sich nach Ausschaltung von VEGF-A mehr Tumorzellen in der Milz ansiedeln. Erklärt werden kann dies dadurch, dass diese Tumorzellen nach intravenöser Injektion in einem geringeren Maß in der Lunge haften bleiben und somit vermehrt in andere Organe wie die Milz zirkulieren können. Da sie dort aber nach zwölf Tagen ebenfalls keine sichtbaren Metastasen bilden, werden die Tumorzellen wohl entweder vom Immunsystem abgeräumt, oder dieselben Nachteile der eingeschränkten Adhäsion wie in der die Lunge gelten auch in der Milz und die Tumorzellen rezirkulieren aus der Milz wieder weiter.

Unabhängig von den Vorgängen in anderen Organen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass von Tumorzellen produziertes VEGF-A die Ansiedlung und Ausbildung von Metastasen in der Lunge fördert. Bei der Suche nach den Mechanismen ließen sich Hinweise auf eine Unterdrückung der T-Zell-gesteuerten Immunantwort sowie eine Bedeutung von VEGF-A in seiner Funktion als Permeabilitätsfaktor und eine damit verbundene bessere Adhäsion von Tumorzellen finden. Davon ausgehend, dass VEGF-A somit einen wichtigen Faktor für die Metastasierung darstellt, wurde in dieser Arbeit

im nächsten Schritt untersucht, ob die Tumorzellen auf die Ausschaltung der VEGF-A-Produktion, und damit die Reduktion der lokal verfügbaren Konzentration, mit der Überexpression eines anderen Faktors reagieren können. Hierbei kommt als möglicher Kompensator in erster Linie das strukturverwandte PlGF in Frage, um dessen Bedeutung es im Folgenden gehen soll.

4.2 Blockade der VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen führt zu einer Erhöhung der PlGF-Sekretion

In einer Vielzahl von Studien zur Anwendung einer gegen VEGF-A gerichteten Therapie, sowohl beim Menschen als auch bei der Maus, wurde als Folge der Therapie eine Zunahme der Plasmakonzentration von PlGF gesehen.^{166 167-169} In Anbetracht dieser bekannten Gegenregulation wurde hier untersucht, ob sich die Ausschaltung der VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen ebenfalls auf den PlGF-Spiegel auswirkt. Da die Hemmung von VEGF-A durch siRNA dabei direkt in den Tumorzellen stattfand, wurde geprüft, ob sich in den Tumorzellen selbst Veränderungen bezüglich der PlGF-Sekretion zeigen lassen. Tatsächlich geht aus Messungen der beiden Faktoren in der Zellkultur ein indirekt proportionaler Anstieg der PlGF-Konzentration zum Abfall von VEGF-A hervor. Diese Daten sind in-vitro erhoben worden, was insofern von Bedeutung ist, da dadurch bewiesen ist, dass die Tumorzellen selbst in der Lage sein müssen, auf ein fehlendes VEGF-A mit einer Mehrproduktion von PlGF zu reagieren. Dass dieser Vorgang für VEGF-A beziehungsweise PlGF spezifisch ist, ergibt sich unter anderem aus Versuchen mit einer gegen andere Proteine gerichteten siRNA.

Wie aber kann die gesteigerte PlGF-Sekretion der Tumorzellen erklärt werden? Über die normale Regulation von PlGF ist bisher noch relativ wenig bekannt. Von unterschiedlichen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass sich die Expression unter bestimmten Bedingungen durch Hypoxie, Entzündungsstimuli (zum Beispiel NFκB) oder auch Enzyme wie Angiotensin II steigern lässt.¹⁷⁰⁻¹⁷³ Bemerkenswerterweise konnte auch für VEGF-A eine PlGF-induzierende Wirkung in Endothelzellen dargestellt werden,^{174, 175} was dem hier beobachteten Effekt einer Steigerung von PlGF bei Wegfall von VEGF-A eher widersprechen würde. Doch die Abläufe in den

Endothelzellen sind sicher nicht direkt auf die verwendeten Tumorzellen übertragbar. In anderen Arbeiten wurde an verschiedenen Modellen festgestellt, dass PlGF die Expression von Vegfa verstärken kann.^{176, 177} Hieraus lässt sich ein Regelkreis ableiten, bei dem PlGF auf den Abfall von VEGF-A hin vermehrt produziert wird, um in seiner Funktion als Induktor von Vegfa die Abnahme zu kompensieren. Diese Gegenregulation kann die hohen PlGF-Werte in der Tumorzellkultur mit siRNA/VEGF-A erklären.

Eine Voraussetzung dafür, dass die Tumorzellen auf den Abfall der VEGF-A-Konzentration reagieren können, ist die Fähigkeit diesen überhaupt zu registrieren. Es muss also einen „Sensor“ für die Tumorzellen geben, der die Anwesenheit von VEGF-A erkennt. Grundsätzlich wird VEGF-A als Protein von Zellen über Oberflächenrezeptoren gebunden. Als klassische Rezeptoren für VEGF-A gelten dabei VEGFR1 und VEGFR2, weswegen in den oben zitierten Studien davon ausgegangen wird, dass die Registrierung des VEGF-A-Abfalls über diese Rezeptoren erfolgt. Jedoch zeigte sich im Genexpressionsarray der in dieser Arbeit verwendeten Melanomzellen, dass keiner der VEGF-Rezeptoren von den Tumorzellen exprimiert wird und man somit primär davon ausgehen kann, dass diese nicht auf der Zelloberfläche vorhanden sind. Was stattdessen für die Messung eines VEGF-A-Spiegels bei den Tumorzellen verantwortlich ist, ist bislang nicht bekannt. In Frage kommen hier die Neuropiline (Nrp). Diese transmembranären Proteine sind als Korezeptoren der VEGF-Rezeptoren bekannt. Sie können die Wirkung von VEGF-A an den Rezeptoren durch Erhöhung der Bindungsaffinität oder durch Verstärkung der intrazellulären Signaltransduktion in manchen Situationen verbessern, sind aber für eine Signalübermittlung grundsätzlich nicht notwendig.¹⁷⁸ Daneben gibt es Hinweise darauf, dass Neuropiline auch eine eigene, unabhängige VEGF-A-Signalübermittlung in die Zellen haben, was unter anderem in Tumorzellen ohne VEGFR gezeigt werden konnte.^{179, 180} Die hier verwendeten D5-Melanomzellen sind für Nrp1 – im Gegensatz zu VEGFR – positiv. Neuropilin1 kann interessanterweise neben VEGF-A auch PlGF binden.¹⁸¹ Es besteht also die Möglichkeit, dass Neuropilin1 bei den Tumorzellen als Sensor für den Wegfall von VEGF-A und durch eine entsprechende Signalübermittlung in die Zellen für eine Hochregulation der PlGF-Expression sorgt.

Neben der Bindung über Oberflächenrezeptoren könnte die VEGF-A-Konzentration auch bereits intrazellulär registriert werden. Es ist bekannt, dass die Mitglieder der VEGF-Familie Dimere bilden, wobei es zu VEGF-A-Homodimeren, PlGF-Homodimeren, aber auch zu VEGF-A/PlGF-Heterodimeren kommen kann. Welche Rolle die Heterodimere genau spielen, ob sie zum Beispiel eher proangiogenetisch – also entsprechend den VEGF-A-Homodimeren – wirken, oder eher antiangiogenetisch, ist zur Zeit noch in der Diskussion.^{67, 182, 183} Normalerweise läuft die Erkennung und Signalvermittlung der Dimere über VEGF-Rezeptoren. Von Bedeutung ist, dass sich diese Heterodimere aber auch schon intrazellulär bilden können, was an Tumorzellen gezeigt wurde.¹⁸⁴ Durch die Wegnahme von VEGF-A kommt es nun in den transfizierten Tumorzellen ausschließlich zur Bildung von PlGF-Homodimeren, welche normalerweise eher selten auftreten würden. Diese Verschiebung des regulären Gleichgewichts zu Gunsten der PlGF-Homodimere könnte für die Zelle den entscheidenden Reiz dazu liefern, das Expressionsmuster im Sinne eines positiven Feedbacks zu verändern. Das Fehlen der Heterodimere hat dabei keine Auswirkungen auf die PlGF-Expression, was sich aus den eigenen Versuchen schließen lässt, bei denen PlGF blockiert wurde und es zu keiner Gegenregulation kam. Bisher ist jedoch nach eigenem Kenntnisstand kein intrazellulärer Mechanismus bekannt, der die PlGF-Homodimere registrieren würde. Letztendlich sind für eine genaue Erklärung der hier beobachteten Gegenregulation weitere, speziell auf diese Fragestellung ausgerichtete Untersuchungen nötig.

Für die Frage nach der Bedeutung von VEGF-A ist die Tatsache entscheidend, dass diese Kompensation überhaupt stattfindet. Offensichtlich kompensiert die Tumorzelle den Wegfall von VEGF-A durch einen Rescue-Mechanismus über die Mehrproduktion von PlGF. Von diesem Punkt ausgehend liegt der nächste Schritt nahe, die Produktion von PlGF in den Tumorzellen ebenfalls durch Transfektion mit einer entsprechenden siRNA zu unterbinden, um so die Rolle von PlGF bei der Metastasierung zu untersuchen.

4.3 Tumorzelleigenes PlGF ist entscheidend an der Ausbildung von Metastasen beteiligt

Schon vor circa 20 Jahren wurde aus der Placenta ein Wachstumsfaktor isoliert, der auf Grund seiner Ähnlichkeit zu VEGF-A der VEGF-Familie zugeschrieben wurde und dank seiner Herkunft den Namen Placenta Growth Factor (PlGF) erhielt.¹⁸⁵ Im Gegensatz zu VEGF-A bindet PlGF nicht an VEGFR2, sondern nur an VEGFR1, wird aber daneben auch von den Ko-Rezeptoren Neuropilin1 und Neuropilin2 erkannt.⁶⁷ Aus Versuchen mit PlGF-Knockout-Tieren weiß man, dass PlGF für die Angiogenese unter physiologischen Bedingungen wohl nur eine untergeordnete Rolle spielt, in pathologischen Situationen, wie zum Beispiel der Angiogenese bei Tumoren, jedoch eine mitunter entscheidende Bedeutung erlangt.¹⁸⁶ Für viele Tumorarten ist eine Überexpression von PlGF beschrieben, was mit verbessertem Wachstum des Tumors, teilweise mit vermehrter Metastasierung und allgemein mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf für den Patienten korreliert.^{169, 186, 187} Diese noch relativ jungen Erkenntnisse führten in letzter Zeit zu zahlreichen in-vitro- und in-vivo-Experimenten mit dem Ziel, die Wirkung von PlGF zu blockieren und so das Verhalten der Tumoren günstig zu beeinflussen. Gute Erfolge konnten dabei zum Beispiel durch den Einsatz eines PlGF-Antikörpers erzielt werden, der im Mausmodell das Tumorwachstum und die Adhäsion von Tumorzellen in der Lunge nach intravenöser Injektion verringern konnte.¹⁶⁹ Auch durch die Gabe von PlGF-blockierenden Peptiden konnte bei einem subkutanen Tumor die Anzahl der Metastasen reduziert werden.¹⁸⁸ Es gibt allerdings ebenso Arbeitsgruppen, die an Hand ihrer Ergebnisse die Bedeutung des PlGF im Rahmen von Tumorerkrankungen als gering einschätzen.¹⁸⁹ Dabei stützen sie sich unter anderem auf ein Tumormodell, bei dem die gleichzeitige Blockierung von VEGF-A und PlGF keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Blockierung von VEGF-A bieten konnte.¹⁹⁰ Diese unterschiedlichen Beurteilungen von PlGF lassen sich sicher zumindest in Teilen auf die verschiedenen verwendeten Versuchsmodelle zurückführen.

In einem Xenograftmodell, bei dem Mäuse humane Tumorzellen erhielten, konnte durch Einsatz eines Maus-spezifischen PlGF-Antikörpers nachgewiesen werden, dass von der Maus produziertes PlGF die Metastasierung positiv beeinflusst.¹⁶⁹ Ungeklärt bleibt dabei, ob auch das von Tumorzellen produzierte PlGF diesen Prozess mitbestimmen kann. Einen weiterführenden Aspekt dazu brachten die Arbeiten zur

prämetastatischen Nische, die dem vom Tumor sekretierten PlGF, zusammen mit VEGF-A, eine Nischen-bildende Funktion zuschreiben.⁵⁸ Dabei sorgt die PlGF-Sekretion der Tumorzellen zu einer Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark, welche dann in anderen Organen unter anderem durch Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen eine prämetastatische Nische vorbereiten, in der es nachfolgend zu einer verbesserten Ansiedlung von Tumorzellen kommt. In den eigenen Versuchen wiederum konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen PlGF insbesondere dann produzieren, wenn VEGF-A blockiert wird, was einen Rescue-Mechanismus unter schwierigen Überlebensbedingungen zeigt. Es wurde deshalb hier mit Hilfe von siRNA untersucht, welchen konkreten Einfluss die PlGF-Sekretion auf die Tumorzellansiedlung im verwendeten Metastasenmodell hat.

Die Ausschaltung der PlGF-Produktion in Tumorzellen beeinträchtigt deren Fähigkeit, sich nach iv-Injektion in der Lunge anzusiedeln in einem solchen Maß, dass es im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit unbehandelten Tumorzellen zu einer Reduzierung der Metastasierung um circa 70 % kommt. Damit steht im Umkehrschluss fest, dass sich für die Tumorzelle durch die Expression von PlGF die Wahrscheinlichkeit, lokal im Gefäßbett zu überleben und anschließend eine Metastase zu bilden, ganz erheblich erhöht. Aus den cDNA-Analysen von Pmel geht außerdem der Hinweis hervor, dass sich die fehlende PlGF-Sekretion schon nach 24 Stunden in einer geringeren Anzahl an vitalen Tumorzellen in der Lunge äußert. Da gleichzeitig keine klaren Steigerungen bei Markern für Apoptose und Nekrose zu verzeichnen sind, ist davon auszugehen, dass die Tumorzellen ohne PlGF schlechter adhärieren können und somit vermehrt aus der Lunge verschwinden. Anders als bei der Blockierung der VEGF-A-Produktion ist die Tumorzelle im Falle von PlGF auch nicht in der Lage, den Ausfall durch Hochregulierung eines anderen Zytokins aus der VEGF-Familie zu kompensieren. Das stimmt mit den Beobachtungen aus Studien anderer Arbeitsgruppen mit PlGF-Antikörpern überein, wo ebenfalls kein Anstieg möglicher Ersatzfaktoren, wie zum Beispiel die anderen Mitglieder der VEGF-Familie, registriert wurde.¹⁶⁹

Nachdem hier die Auswirkungen einer PlGF-Blockade auf die Metastasierungsrate gezeigt wurden, stellt sich im nächsten Schritt die Frage nach den genauen Mechanismen, mit denen PlGF Einfluss nehmen kann. Dabei können grundsätzlich

zwei Wirkprinzipien unterschieden werden: erstens eine Verstärkung der VEGF-A-Wirkung durch PlGF und zweitens eine eigenständige, von VEGF-A unabhängige Funktion. Zunächst soll die erste Möglichkeit besprochen werden. Sowohl VEGF-A, als auch PlGF sind Liganden des VEGFR1; für VEGF-A jedoch scheint diese Bindung in erster Linie eine Reduzierung seiner Verfügbarkeit für VEGFR2 zu bedeuten, was eine Abschwächung der Signalwirkung von VEGF-A bedeutet. PlGF wiederum kann VEGF-A aus seiner Bindung mit VEGFR1 verdrängen und so die effektive Konzentration von VEGF-A vor Ort für VEGFR2 erhöhen.⁸² Derselbe Vorgang gilt auch für die lösliche Variante des VEGFR1, sVEGFR1,¹⁹¹ wodurch PlGF durch Verdrängung insgesamt eine relevante Menge an freiem VEGF-A zur Verfügung stellen kann.

Daneben besteht für PlGF noch eine weitere Möglichkeit, die Wirkung von VEGF-A zu potenzieren und zwar über eine Verstärkung des VEGFR2-Signals. So konnte gezeigt werden, dass eine PlGF-Bindung an VEGFR1 die Signalübermittlung von VEGFR2 positiv beeinflusst. In der entsprechenden Zelle kommt es durch die Aktivierung von VEGFR1 durch PlGF zu einer Phosphorylierung des intrazellulären Anteils von VEGFR2.¹⁸³ Diese Veränderung wirkt sich im Falle einer gleichzeitigen Aktivierung von VEGFR2 durch VEGF-A in einer deutlich gesteigerten Signalübermittlung aus. Auch extrazellulär kann PlGF den Wirkungsgrad von VEGFR2 steigern und zwar über die Bildung von Heterodimeren mit VEGF-A. Kommt es über den VEGF-A-Teil eines solchen Heterodimers zur Verbindung mit VEGFR2, kann der PlGF-Teil gleichzeitig an VEGFR1 haften und so durch die örtliche Beziehung der beiden Rezeptoren zu einer Rezeptordimerisation führen, was eine verstärkte VEGF-A-Übermittlung über VEGFR2 zur Folge hat.¹⁸³ Auch wenn diese Effekte hauptsächlich in Bezug auf Angiogenese demonstriert wurden, so sind die Mechanismen sicher auf andere Situationen, wie zum Beispiel die Tumorzellansiedlung, übertragbar. Für die Interpretation der Funktionsweise von PlGF bedeutet dies, dass grundsätzlich alle schon bei VEGF-A benannten möglichen Auswirkungen auf eine Nischenbildung auch für PlGF relevant sind, wie zum Beispiel die Funktion als Permeabilitätsfaktor für das Endothel.

Das Wirkspektrum von PlGF geht jedoch weit über eine reine VEGF-A-Unterstützung hinaus. Über VEGFR1 ist PlGF in der Lage, eigenständige Signale unabhängig von VEGF-A an Zellen zu übermitteln.⁶⁷ Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung

von PlGF an VEGFR1 ein anderes intrazelluläres Phosphorylierungsmuster und ein anderes Genexpressionsmuster zur Folge hat, als wenn VEGFR1 durch VEGF-A aktiviert würde.^{183, 192} Wie diese unterschiedlichen Wirkungen trotz Bindung an den gleichen Rezeptor zu Stande kommen ist bisher nicht bekannt. Es folgt aber, dass PlGF während der Ansiedlung von Tumorzellen unabhängig von VEGF-A prinzipiell auf alle Zellen mit VEGFR1 einwirken kann, also: Tumorzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Knochenmarkszellen und auch Immunzellen, auf die alle im Folgenden eingegangen werden soll.

Für VEGFR1⁺-Tumorzellen kann PlGF als Überlebens- und Proliferationsfaktor dienen und so die Metastasierung unterstützen.¹⁶⁹ Diese Tatsache hat für die vorliegende Arbeit allerdings keine Bedeutung, da die verwendeten Tumorzellen kein Expressionssignal für VEGFR1 aufweisen und somit davon ausgegangen werden kann, dass VEGFR1 nicht vorhanden ist. Außerdem zeigen die transfizierten gegenüber den unbehandelten Tumorzellen in-vitro keinen Überlebensnachteil, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass sich PlGF direkt auf die Tumorzellen auswirkt.

Dagegen hat der Einfluss von PlGF auf Endothelzellen, welche konstant VEGFR1 exprimieren, eine große Bedeutung. Über VEGFR1 kann PlGF einerseits ein Überlebenssignal liefern, andererseits kann es in hohen Konzentration, wie zum Beispiel in einem soliden Tumor – aber auch lokal begrenzt bei einer sekretierenden Tumorzelle im Gefäß – für Lücken in Endothel und Basalmembran sorgen.⁸⁴ PlGF kann also, ebenso wie VEGF-A, die Permeabilität eines Gefäßes erhöhen.¹⁹³ Zusätzlich gibt es Hinweise, dass den Tumorzellen durch lokal vorhandenes PlGF die Invasion durch die Basalmembran erleichtert wird.¹⁸⁸ PlGF schafft Lücken im Endothel und ermöglicht so den ankommenden Tumorzellen eine feste Adhäsion an die EZM. Wird die PlGF-Produktion nun unterdrückt, wäre zu erwarten, dass die Tumorzellen entweder vermehrt vor Ort absterben, oder wieder rezirkulieren können. Absterbende Zellen können durch die Freisetzung von Zellbestandteilen eine Entzündungsreaktion verursachen, weswegen hier im Tiermodell untersucht wurde, ob sich nach Blockade der PlGF-Produktion mit siRNA Unterschiede in der Entzündungsreaktion am Ort der Tumorsiedlung finden. Als Marker einer Entzündungsreaktion wurde die Expression von Crp und Tnfsf10 gewählt. Dabei zeigten sich in den ersten 48h nach

Tumorzelleinjektion in der Signalthöhe keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Somit ergibt sich kein Hinweis auf eine verstärkte Entzündungsreaktion durch mehr absterbende Tumorzellen. Einzige Ausnahme bei den Messungen war die Untersuchung des Gens Ptx3, wo sich in der Gruppe ohne PlGF in den ersten 24 Stunden eindeutig höhere Expressionswerte als in der Kontrollgruppe zeigten. Pentraxine sind Moleküle, die zur unspezifischen Immunantwort durch Antigen-Erkennung beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass Ptx3 insbesondere in Situationen der Reperfusion nach Ischämie exprimiert wird.¹⁵⁸ In der Situation der Adhäsion verschließt die Tumorzellen mitsamt dem umgebenden Thrombus das Blutgefäß und verursacht so eine Ischämie im Abstromgebiet. Ein Anstieg des Ptx3-Signals in den RNA-Analysen weist also auf eine Reperfusion hin, was in diesem Fall bedeutet, dass die Tumorzellen aus dem Gefäßbett verschwinden. Dass die Tumorzellen ohne PlGF dabei mit dem Blutstrom aus dem Gefäßbett entfernt werden und es nicht etwa zu einer schnelleren Invasion der Tumorzellen ins Lungengewebe und dadurch zum Verschwinden aus dem Gefäß kommt, ergibt sich durch die geringeren Pmel-Messungen und die später sichtbare, deutlich geringere Metastasenzahl. Somit lässt sich schlussfolgern, dass es bei Tumorzellen ohne PlGF-Produktion vermehrt zu einem frühen, das heißt innerhalb der ersten 24 Stunden stattfindenden, Abtransport aus den Lungenkapillaren mit dem Blutstrom kommt. Die Adhäsion an das Lungenendothel scheint also ohne PlGF erheblich beeinträchtigt zu sein.

Neben der Wirkung auf Endothelzellen kann PlGF auch über die Stimulation von VEGFR1⁺-Fibroblasten Einfluss auf die Metastasenbildung nehmen. Es wurde gezeigt, dass diese durch PlGF zu mehr Expression von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF-A, aktiviert werden.^{177, 186} Diese können sich dann ihrerseits positiv auf das Wachstum und das Überleben der Tumorzellen auswirken. Dementsprechend wurde hier untersucht, ob sich durch die Ausschaltung der PlGF-Sekretion der Tumorzellen Veränderungen in der Expression von Vegfa in der Lunge ergeben. In der Auswertung zeigen sich nach 48 Stunden in der Gruppe mit siRNA/PlGF die höchsten Werte. Der Wegfall von PlGF scheint sich also nicht negativ auf die Expression von Vegfa auszuwirken. Die Frage ist jedoch wie es zu der gesteigerten Expression kommt. Die Tumorzellen kommen dafür nicht in Frage, da in-vitro gezeigt wurde, dass sich die VEGF-A-Sekretion durch Transfektion mit siRNA/PlGF eher erniedrigt, auf keinen Fall

aber erhöht. Auch eine insgesamt erhöhte Tumorlast ist als Ursache ausgeschlossen, denn zu den gemessenen Zeitpunkten sind in der PlGF-Gruppe schon weniger Tumorzellen als in der Kontrollgruppe vorhanden. Letztlich muss die Expressionssteigerung von Zellen des Lungengewebes ausgehen. Welche Zellen genau dafür verantwortlich sind und wie es zu dem Anstieg kommt ist unklar. Fest steht dagegen, dass sich die Expressionssteigerung nicht in einer vermehrten Verfügbarkeit von VEGF-A im Plasma auswirkt. Die Plasmakonzentrationen von VEGF-A sind im Verlauf nach Tumorzellinjektion in den untersuchten Mäusen der si/PlGF-Gruppe deutlich unter denen der Kontrollgruppe. Somit kann festgehalten werden, dass durch die Ausschaltung der PlGF-Produktion in den Tumorzellen die Expression von Vegfa in der Lunge zwar leicht zunimmt, es aber gleichzeitig zu einer Abnahme der VEGF-A-Konzentration im Plasma kommt. Da die Expressionssteigerung unter Ausschaltung von PlGF zu Stande kommt, kann der Hypothese widersprochen werden, dass PlGF seine Metastasen-fördernde Funktion durch Stimulation von VEGFR1⁺-Fibroblasten zu mehr VEGF-A-Produktion erreicht.

Als weitere Zielzellen von PlGF kommen hämatopoetische Stammzellen (HPCs) in Frage. Die Bedeutung der Mobilisation von VEGFR1⁺-HPCs durch PlGF für die Ausbildung einer metastatischen Nische wurde für einen prämetastatischen Zustand nachgewiesen, also noch bevor sich die Tumorzelle im Gefäßsystem befindet.⁵⁸ Dafür verwendeten Kaplan et al. ein Tumormodell, in dem den Versuchsmäusen zunächst Tumorzellen subkutan in die Hinterläufe injiziert wurden. Von dem sich entwickelnden Primärtumor wurden dann Wachstumsfaktoren wie VEGF-A und PlGF sekretiert, die zu einer Mobilisation von HPCs aus dem Knochenmark und zur Einwanderung an Orte zukünftiger Metastasenbildung führten. Gezeigt wurde dies durch den Nachweis von HPCs in der Lunge 14 Tage nach intrakutaner Gabe der Tumorzellen, ohne dass zu diesem Zeitpunkt schon metastasierende Tumorzellen in der Lunge nachgewiesen werden konnten. In diesem Modell war also der Primärtumor zwei Wochen lang sekretorisch aktiv und konnte in diesem Zeitraum eine prämetastatische Nische vorbereiten. In dem für diese Arbeit verwendeten Metastasenmodell spielen diese Vorgänge jedoch keine Rolle, da die Tumorzellen nach Injektion unmittelbar im Lungengefäßsystem ankommen, ohne dass sich vorher eine prämetastatische Nische durch die Auswirkungen eines Primärtumors entwickeln kann. Die Reduktion der

Metastasenzahl nach Blockade der PlGF-Produktion in den Tumorzellen kann also nicht mit dem Konzept der prämetastatischen Nische erklärt werden. Es ist in dem hier verwendeten Metastasenmodell aber möglich, dass es zur Rekrutierung von HPCs nach Ankunft der Tumorzellen in der Lunge kommt und diese dann eine Nische mitgestalten. Doch es ist davon auszugehen, dass der Einfluss der HPCs auf das Überleben der Tumorzellen in den ersten Tagen nach Injektion relativ gering bleibt, da in den von Kaplan et al. durchgeführten Untersuchungen das Auftreten von HPCs in der Lunge erst zwölf Tage nach Tumorimplantation beobachtet wurde. Das heißt, für die initialen Vorgänge der Adhäsion und Extravasation, die sich innerhalb der ersten zwölf Tage abspielen, haben die HPCs keine Bedeutung.

Neben den HPCs gibt es noch weitere Faktoren, die an der Bildung von Metastasen beteiligt sind. Einen großen Einfluss auf die Ansiedlung von Tumorzellen haben die Zellen des Immunsystems. Dazu zählen unter anderem Makrophagen, die als Abwehrzellen eigentlich für eine Bekämpfung von Tumorzellen zuständig sind, für die aber gezeigt werden konnte, dass sie als so genannte „Tumor-assoziierte Makrophagen“ (TAMs) vielfältig an der Progression einer Tumorerkrankung beteiligt sein können.¹⁹⁴ In Bezug auf mögliche Wirkmechanismen von PlGF ist relevant, dass für Makrophagen eine VEGFR1-abhängige Steigerung der Mmp9-Expression und dadurch eine erleichterte Metastasenbildung beschrieben worden ist.^{60, 195} So lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Tumorzellen durch die Sekretion von PlGF, als Liganden von VEGFR1, für eine Degradation der Basalmembran sorgen, um sich das Vordringen ins Gewebe zu erleichtern. Die eigenen Ergebnisse zur Expression von Mmp9 in den Lungen weichen jedoch von diesem Konzept ab. Während sich in der Gruppe mit den unbehandelten Tumorzellen – also denjenigen mit PlGF-Produktion – erst nach 48 Stunden erhöhte Werte ergeben, zeigt sich in der siRNA-Gruppe schon 2 Stunden nach Injektion erhöhte Expressions-Signale in der Lunge, wobei allerdings die Expression von Mmp9 nach 48 Stunden komplett verschwindet. Wie es dazu kommt, dass das Fehlen von PlGF in den ersten 24 Stunden zu solch einer Steigerung der MMP9-Bildung führt, ist nicht bekannt, scheint aber auch in Anbetracht der später wesentlich weniger auftretenden Metastasen keinen Überlebensvorteil zu bringen. Entweder kommt es durch den Wegfall von PlGF doch zu einer Mehrproduktion eines anderen Faktors, der wiederum kurzfristig die MMP9-Sekretion steigern kann, oder die

hohe MMP9-Aktivität nach 2 und 24 Stunden ist Ausdruck einer verstärkt ablaufenden immunologischen Abwehrreaktion, an der auch Makrophagen beteiligt sind. Das Expressionsmuster nach 48 Stunden jedenfalls stimmt dann mit der Hypothese überein, dass eine fehlende PlGF-Wirkung eine geringere Mmp9-Expression zur Folge hat. Dadurch ergibt sich eine verschlechterte Degradation der Basalmembran und schließlich eine verminderte Ansiedlung.

Neben den Effekten auf TAMs kann PlGF auch supprimierend auf potenziell angreifende Immunzellen wirken und so das Überleben der Tumorzelle verbessern. Insbesondere für die Ausreifung von Dendritischen Zellen konnte eine inhibitorische Funktion von PlGF gezeigt werden, die sich auch auf eine T-Zell-gesteuerte Antwort auswirken kann.^{196, 197} Hierzu zeigen die eigenen Messungen, dass es bei Tumorzellen mit PlGF-Sekretion in den ersten 48 Stunden zu einer geringeren Immunantwort kommt. Dargestellt wurde dies durch die geringere Expression von CD8a und Gzma, als Marker für zytotoxische T-Zellen, in der Gruppe ohne PlGF-Blockierung. Ein weiterer Marker der spezifischen Immunantwort, das in CD8⁺-T-Zellen enthaltene Prf1, ist in der siRNA/PlGF-Gruppe in den ersten 24 Stunden stärker exprimiert als in der Kontrolle, dann allerdings nach 48 Stunden gar nicht mehr nachweisbar. Dass die Immunantwort zu diesem Zeitpunkt schon abgeschlossen ist und deswegen kein Expressionssignal mehr nachweisbar ist, lässt sich dadurch widerlegen, dass die anderen Messwerte der spezifischen Entzündung zu diesem Zeitpunkt noch deutlich vorhanden sind. Von daher ist eher von einer Änderung des Expressionsmusters der T-Zellen auszugehen. Insgesamt weisen die hier beschriebenen Daten daraufhin, dass eine Tumorzelle durch die Sekretion von PlGF eine Reduktion der Immunantwort hervorruft und sich damit einen Überlebensvorteil schafft. Das heißt ein Fehlen von PlGF führt zu einer stärkeren Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen und verringert dadurch die Überlebenswahrscheinlichkeit der Tumorzellen.

Bei der Suche nach den Wirkmechanismen von PlGF ergaben sich Hinweise auf mehrere unterschiedliche Möglichkeiten. Neben der Beeinflussung des Immunsystems wurde hier gezeigt, dass PlGF die Tumorzellen insbesondere in seiner Funktion als Permeabilitätsfaktor bei der Überwindung der Endothelbarriere zu einer stärkeren Adhäsion unterstützt. Eine zentrale Frage ist, ob PlGF dabei nur als Verstärker von

VEGF-A fungiert, oder auch davon unabhängige, eigene Auswirkungen hat. In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Metastasenversuch in dieser Arbeit weiterführend, bei dem in den Tumorzellen sowohl VEGF-A, als auch PlGF durch die vorherige Transfektion mit siRNA blockiert wurde. Es zeigt sich, dass die Bildung von Metastasen gegenüber einer Kontrollgruppe deutlich reduziert wird, gegenüber einer alleinigen Blockierung von PlGF allerdings keinen Unterschied aufweist. Die Unterdrückung von VEGF-A zusätzlich zu PlGF bringt also keinen weiteren Vorteil, was bedeutet, dass über die Wegnahme von PlGF auch schon die Signalwirkung von VEGF-A ausgeschaltet ist und PlGF somit hauptsächlich durch eine enorme Potenzierung der VEGF-A-Wirkung wirkt.

Wie sind nun alle bisher diskutierten Ergebnisse zu bewerten? Ursprünglicher Ausgangspunkt der Arbeit war die Frage nach der Bedeutung von VEGF-A bei der hämatogenen Metastasierung. Hierzu wurde festgestellt, dass VEGF-A die Tumorzellen dabei unterstützt, sich in einem fremden Organ anzusiedeln. Durch eine Blockierung der VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen konnte eine signifikante Reduzierung der Metastasen erreicht werden. Zudem wurde festgestellt, dass der Ausfall von VEGF-A durch einen Anstieg der PlGF-Produktion in den Tumorzellen ausgeglichen wurde. PlGF wiederum scheint hauptsächlich über eine deutliche Verstärkung der VEGF-A-Wirkung zu funktionieren. Dabei ist das Vorhandensein von PlGF so entscheidend, dass dessen Ausfall nicht von VEGF-A kompensiert werden konnte und es bei Ausschaltung von PlGF zu einem stärkeren Rückgang der Metastasierung kam, als bei der alleinigen Blockade von VEGF-A.

Diese Ergebnisse haben eine hohe klinische Bedeutung: Die großen Erwartungen, die im Bereich der Krebsbehandlung an den Einsatz von VEGF-A-Antikörpern, als erste spezifische antiangiogenetische Therapie, gerichtet wurden, konnten bis heute nicht erfüllt werden. Die erreichten Lebensverlängerungen liegen im Durchschnitt im Bereich von Monaten und können somit bislang nicht als ein Durchbruch in der Krebstherapie betrachtet werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern mit dem von den Tumorzellen abhängigen Rescue-Mechanismus über die Mehrproduktion von PlGF eine Erklärung für die eingeschränkte Effektivität einer allein auf VEGF-A gerichteten Therapie, vor allem in Bezug auf das Auftreten von Metastasen. Da hier ebenfalls das

mögliche Potential zur Reduzierung der Metastasenzahl bei Blockierung dieser Kompensation gezeigt wurde, steht aber auch fest, dass der Ansatz der antiangiogenetischen Therapien weiter aussichtsreich bleibt. Zur Steigerung der Ansprechraten auf eine gegen VEGF-A gerichtete Therapie muss auf Grundlage dieser Arbeit nach den Regulationsmechanismen geforscht werden, die in diesem Falle in den Tumorzellen für eine Überexpression von PlGF sorgen. Erst wenn diese verstanden sind, kann ein spezifisches Mittel zur Unterbindung gefunden werden. Eine andere Möglichkeit wäre der Versuch, direkt die Wirkung von PlGF zu inhibieren. Auch dazu laufen zurzeit die ersten klinischen Studien an und es bleibt abzuwarten, ob die klinischen Ergebnisse die hier gezeigten Effekte bestätigen können.¹⁹⁸

Nach allem was bisher erläutert wurde, spielen die beiden Wachstumsfaktoren VEGF-A und PlGF insbesondere in ihrer Funktion als Permeabilitätsfaktoren des Endothels bei der Ansiedlung von metastasierenden Tumorzellen eine Rolle. Dabei gelingt es durch Retraktion von Endothelzellen Lücken in der Endothelschicht zu schaffen und so den Tumorzellen Zugang zu Bestandteilen der EZM zu ermöglichen. Die in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass PlGF dabei als Verstärker die VEGF-A-Wirkungen unterstützt. Doch bevor sie diese Funktionen überhaupt ausüben können, muss es zu einem initialen Arrest der Tumorzelle in einem Gefäß kommen, damit durch die Sekretion der Faktoren eine lokal erhöhte Konzentration entstehen kann. Dieses erste Hängenbleiben kann durch die Bindung der Tumorzellen an Proteine, wie zum Beispiel Fibronectin, gefördert werden.

In einer Arbeit zur metastatischen Nische konnten an Orten der Tumorzellansiedlung eindeutig erhöhte Mengen an Fibronectin nachgewiesen werden.⁵⁸ Das heißt, Fibronectin ist während der Tumorzellansiedlung vorhanden und damit möglicherweise auch in diese Vorgänge miteingebunden. In der erwähnten Studie wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um zelluläres Fibronectin in der EZM handelt. Doch in der Situation des initialen Arrests, befindet sich die Tumorzelle noch in einem Blutgefäß und hat somit keinen Kontakt zur EZM. Das im Plasma vorkommende Fibronectin wäre dagegen für die Tumorzellen direkt verfügbar und könnte so die Adhäsion fördern. Es wurde deshalb hier untersucht, ob plasmatisches Fibronectin die Ansiedlung von Tumorzellen in einem fremden Organ unterstützen kann.

4.4 Plasmatisches Fibronectin ist entscheidend an der Ansiedlung von Tumorzellen beteiligt

Das Glykoprotein Fibronectin ist sowohl Bestandteil der EZM als auch im Blutplasma vorhanden, kommt also grundsätzlich in zwei unterschiedlichen Konformationen vor: einmal als zelluläres Fibronectin (cFn), zum anderen in einer löslichen Form als plasmatisches Fibronectin (pFn). Während cFn von vielen Zelltypen, unter anderem Fibroblasten, produziert werden kann, wird pFn ausschließlich von Hepatozyten ins Blut sezerniert. Spezifisch für Fibronectin sind die vielen Bindungsstellen für andere Glykoproteine und auch Integrinrezeptoren von Zellen, wodurch sich die Funktion von cFn als Mediator von Zell-EZM-Interaktionen wie zum Beispiel Zelladhäsion oder Zellwanderung erklärt.¹⁰⁹ Die plasmatische Variante von Fibronectin hingegen liegt im Blut zunächst in einer solchen Konformation vor, dass die Bindungsstellen verborgen bleiben. Dadurch wird eine ungewollte Interaktion von Zellen im Blutstrom verhindert. Kommt es jedoch auf Grund einer Endothelverletzung zur Ausbildung eines Thrombus, entfaltet sich pFn und ist durch Vernetzung von Zellen, Fibrin und Bestandteilen der EZM ganz entscheidend an der Stabilisierung des Blutgerinnsels beteiligt.¹⁰⁸ Neben diesen physiologischen Funktionen kann Fibronectin auch eine Rolle bei der Bildung von Metastasen spielen. So finden sich an Orten der Tumorzellansiedlung erhöhte Mengen an Fibronectin⁵⁸ und auch in den eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass es nach intravenöser Injektion von Tumorzellen zu einer deutlichen Steigerung der vorhandenen Menge Fibronectins in der Lunge kommt.

Prinzipiell können beide Varianten des Fibronectins, also cFn und pFn, an dem Gesamtvorgang der Metastasierung beteiligt sein. In den Untersuchungen von Kaplan et al. wird davon ausgegangen, dass es sich bei der Ansammlung von Fibronectin am Ort der Metastasenbildung um cFn handelt. Während aber Kaplan et al. Tumorzellen s.c. am Hinterlauf der Versuchsmäuse injizierten und dann die Veränderungen in der Lunge beobachteten, wurde hier ein Modell verwendet, bei dem die Tumorzellen direkt in das Gefäßsystem injiziert werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Tumorzellen in der Lunge auf eine unvorbereitete, intakte Endothelschicht treffen. Damit ist der direkte Zugang zu cFn nicht möglich und es erscheint plausibel, dass stattdessen pFn insbesondere für die ersten Phasen der Adhäsion von größerer Bedeutung ist. Tatsächlich gibt es neben dieser theoretischen Überlegung auch eine

Reihe von Hinweisen aus Forschungsexperimenten anderer Arbeitsgruppen, die einen wichtigen Einfluss von pFn auf metastasierende Tumorzellen zeigen. Am bedeutendsten ist hierbei der Einsatz von RGD-Peptiden, die durch kompetitive Hemmung die pFn-Funktionen einschränken sollen, womit bei in-vitro- und in-vivo-Versuchen eine allgemeine Reduzierung der Metastasierung erreicht werden konnte.¹³⁸⁻¹⁴¹ Das Problem bei diesem Modell ergibt sich aus der Tatsache, dass RGD-Peptide nicht absolut spezifisch die Funktion von pFn einschränken. Sie können neben den pFn-spezifischen Integrinrezeptoren, noch von vielen weiteren Integrinrezeptoren gebunden werden und so unterschiedliche Signale an die entsprechenden Zellen vermitteln. Dadurch wird ein direkter Rückschluss von den Versuchsergebnissen auf die Bedeutung von pFn schwierig.¹¹⁸

Goldstandard zur Feststellung der konkreten Funktion eines Proteins ist der Knockout in einem Versuchstier und die anschließende Beobachtung von Veränderungen. Diese Methode wurde beim Fibronectin lange Zeit dadurch verhindert, dass ein Knockout bei Mäusen schon pränatal tödlich endet. Durch die Etablierung konditioneller Fibronectin-Knockoutmäuse ist es jedoch möglich, eine normale Entwicklung der Versuchstiere zu gewährleisten, aber nach Induktion des Knockouts das Gen für Fibronectin aus der DNA zu entfernen. Dabei findet der induzierte Knockout ausschließlich in den Leberzellen statt, wodurch es auch nur zum alleinigen Verschwinden von pFn kommt. Die Produktion von cFn bleibt unbeeinträchtigt.

Die Induzierung des Knockouts wird durch dreimalige, intraperitoneale Gabe von poly(dI-dC) begonnen. Die dadurch ausgelöste Entzündungsreaktion führt zu einer Aktivierung des Mx-Cre-Promotors in den Hepatozyten und in der Folge kann die produzierte Rekombinase die Geninformation von pFn, die an den flankierenden Lox-P-Sites von der Rekombinase erkannt wird, aus dem Genom entfernen. Es wurde zu diesem Verfahren bereits gezeigt, dass die so behandelten Mäuse einen kaum veränderten Phänotypen aufweisen.¹⁴⁹ Die Verifizierung des tatsächlichen Verschwindens von pFn aus dem Plasma erfolgte einerseits durch die genetische Überprüfung aller verwendeten Mäuse, ob die entsprechende Geninformation für Mx-Cre vorhanden ist. Andererseits wurden nach erfolgter Induktion die pFn-Konzentration im Plasma der induzierten Mäuse, sowohl der K.o.-Mäuse als auch der Kontrollmäuse,

mittels ELISA bestimmt. Die eindeutige Übereinstimmung zwischen den Mäusen mit dem Knockout-spezifischen genetischen Hintergrund und dem vollkommenen Verschwinden von pFn in diesen Mäusen belegt die Zuverlässigkeit und die Anwendbarkeit dieses Verfahrens. Durch Verwendung dieser Mäuse ist es also möglich, eine absolut sichere Aussage über die Bedeutung von pFn bei der Ausbildung von Metastasen zu treffen.

In einem Metastasenversuch mit den Knockoutmäusen konnte hier signifikant gezeigt werden, dass sich die Metastasierung in Abwesenheit von pFn um circa 80 Prozent reduzieren lässt. Dabei wurde der Anteil der Tumorzellen in der Lunge zwölf Tage nach intravenöser Injektion in einer Versuchsgruppe mit induziertem Knockout und einer Kontrollgruppe verglichen. Somit beweisen die Ergebnisse ganz eindeutig, dass pFn die Entwicklung einer Metastase aus einer sich im Gefäßsystem befindlichen Tumorzelle unterstützt.

Um die Frage zu klären, ob pFn dabei auch schon an den ersten Schritten der Tumorzellansiedlung, also der Adhäsion, beteiligt ist, wurden hier zusätzlich 2-, 24- und 48-Stunden-Versuche durchgeführt. Es zeigt sich, dass bei Mäusen ohne pFn bereits nach zwei Stunden weniger Tumorzellen in der Lunge vorhanden sind, als bei den Kontrollen. Das heißt, das Fehlen von pFn wirkt sich schon unmittelbar in der ersten Phase der Tumorzellansiedlung aus.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich während des Verfassens dieser Arbeit auch in einem anderen Metastasenmodell.¹⁹⁹ Dabei beobachteten Malik et al. in ihren Versuchen, dass sich die Anzahl der Tumorzellen in der Lunge bis vier Stunden nach Injektion in der Versuchs- und Kontrollgruppe nicht unterscheidet, sondern dass sich das fehlende pFn erst anschließend auswirkt. Diese abweichenden Messergebnisse können möglicherweise durch Verwendung unterschiedlicher Tumorzelllinien erklärt werden. Daneben spielt aber auch die Messmethode eine Rolle. Während bei Malik et al. unter dem Mikroskop zufällig ausgewählte Blickfelder nach Tumorzellen durchsucht wurden, wurde hier durch die Messung der Pmel-Expression in mehreren Lungen ein besserer Durchschnittswert geschaffen. Deshalb ist für das hier verwendete Metastasenmodell mit Sicherheit davon auszugehen, dass sich ein ausgeknocktes pFn schon früh im Ablauf der hämatogenen Metastasierung auswirkt.

Es stellt sich als nächstes die Frage, wie pFn das Schicksal einer wandernden Tumorzelle in diesem frühen Zeitraum beeinflussen kann. Die Tumorzelle durchläuft nach ihrer Injektion mehrere Phasen, in denen sie Kontakt zu pFn hat: zunächst den Transport im Blutstrom, dann die Adhäsion in den Lungenkapillaren und schließlich die Extravasation beziehungsweise Invasion ins Lungengewebe. Inwieweit sich ein Fehlen von pFn in den jeweiligen Phasen auf die metastasierende Tumorzelle auswirken kann, soll im Folgenden diskutiert werden.

4.4.1 Transport der Tumorzelle mit dem Blutfluss

Die passive Beförderung mit dem Blutfluss stellt für die Tumorzelle ein erstes Hindernis dar. Insbesondere mechanische Scherkräfte, aber auch Immunzellen und das Fehlen eines Zellkontakts sorgen insgesamt für ein ungünstiges Milieu. Da aber die Zeit, die die Tumorzelle von der Injektion bis zum Erreichen der Lunge im Blutstrom verbringt, nur sehr kurz ist, werden die Immunzellen nicht wesentlich das Überleben der Tumorzellen in dieser Phase beeinflussen können. Genauso wie eine mögliche Apoptose auf Grund fehlenden Zellkontaktes kommen diese Effekte wohl eher im Anschluss an die Adhäsion zum Tragen und werden deshalb auch dort diskutiert. Dagegen kann eine mechanische Zerreißung der Tumorzelle durch die einwirkenden Kräfte des Blutflusses unmittelbar nach Eintritt ins Gefäß stattfinden. Einen Schutz gegen diese Zerstörung kann pFn liefern. An Hand durchflusszytometrischer Bestimmungen konnte hier gezeigt werden, dass die Tumorzellen in der Lage sind, pFn an sich zu binden. Plasmatisches Fibronectin besteht grundsätzlich aus Dimeren, so dass nach Bindung einer Tumorzelle durch den einen Teil des Dimers noch eine weitere Tumorzelle am anderen Ende des Dimers gebunden werden kann. Die Tumorzellen können sich somit über das pFn auf ihren Zelloberflächen noch im Gefäß aneinander binden und so regelrechte Tumorzellaggregate bilden. In solchen Aggregaten kann man davon ausgehen, dass die inneren Zellen gegenüber mechanischer Zerstörung, zum Beispiel durch den Aufprall an Gefäßaufzweigungen, geschützt sind. Dieser Mechanismus ist mit ein Grund, warum diesen Tumorzellclustern eine verbesserte Tumorzellansiedlung zugeschrieben wird.⁴² Doch während in dieser Arbeit die Bindung von pFn an die Tumorzellen im FACS klar belegt werden konnte, zeigten die mikroskopischen Bilder der Lungen keine Hinweise darauf, dass sich die Tumorzellen

über pFn aneinander binden. Zwei Stunden nach Injektion der Tumorzellen konnten bei den Kontrollmäusen mit pFn keinesfalls mehr Tumorzellaggregate gefunden werden als in den pFn-Knockoutmäusen. In aller Regel waren in beiden Gruppen einzelne Tumorzellen in den Lungengefäßen vorhanden. Es kam also in diesem Metastasenmodell weder mit, noch ohne pFn während des kurzen Transports im Blutstrom zur Verbindung von Tumorzellen untereinander.

4.4.2 Adhäsion der Tumorzelle

In dem in dieser Arbeit verwendeten Metastasenmodell treffen die injizierten Tumorzellen nach der Passage des rechten Herzens auf das Kapillargebiet der Lunge, in welchem sie dann die Möglichkeit haben, sich anzusiedeln. Der erste Schritt dazu ist eine erfolgreiche Adhäsion, die in drei Abschnitte untergliedert werden soll: Zunächst das initiale, mechanische Hängenbleiben der Tumorzelle, gefolgt von einer vorläufigen Bindung ans Endothel und schließlich die feste Adhäsion an Basalmembran und Bestandteile der EZM. In allen Phasen kann pFn beteiligt sein, was im Folgenden ausgeführt werden soll.

Aufgrund der Größenunterschiede von Tumorzelle und Kapillare ist davon auszugehen, dass es in der Lunge zumindest zu einer deutlichen Verlangsamung, wenn nicht zu einem Steckenbleiben der Tumorzelle kommt. Aus dem regelmäßigen Auftreten von Metastasen in nachgeschalteten Organen – sowohl beim Menschen, als auch bei Mäusen – ergibt sich aber, dass Tumorzellen in der Lage sein müssen, diese Engstellen in den Kapillaren lebend zu überwinden. Dies kann ihnen zum Beispiel durch Veränderung der Zellform gelingen.²⁰⁰ Dabei kann die Fähigkeit der Tumorzellen, aus dem Plasma Fibronectin an sich zu binden, eine Rolle spielen. Einerseits vergrößert sich der Durchmesser einer Tumorzelle mit Fibronectinummantelung, was das Steckenbleiben in der Kapillare fördert, und andererseits wird zusätzlich die Flexibilität der Zelle verringert und damit die Möglichkeit der Passage von Engstellen erschwert. Aus den durchgeführten Pmel-Expressionsanalysen ergibt sich, dass sich in den pFn-Knockoutmäusen schon zwei Stunden nach Injektion weniger Tumorzellen in der Lungen befinden als in den Kontrollen, was eindeutig für eine erleichterte Passage durchs Lungenkapillargebiet in Abwesenheit von pFn spricht und damit eine Bedeutung von pFn für den initialen Arrest bekräftigt. Als Einschränkung muss erwähnt werden,

dass zu diesem Zeitpunkt auch schon andere Auswirkungen eines fehlenden pFn – wie die Vermittlung spezifischer Bindungen von Tumorzellen an Strukturen der EZM – auftreten können, so dass die einzelnen Effekte nicht genau voneinander getrennt betrachtet werden können. Einen genaueren Aufschluss darüber, welchen Einfluss eine eingeschränkte Flexibilität der Tumorzellen durch pFn-Ummantelung hat, könnte man durch Intravitalmikroskopie der Lunge erhalten.

Nach dem initialen Arrest geht es für die Tumorzelle im nächsten Schritt darum, eine erste Bindung mit dem Endothel einzugehen. Dabei muss zunächst geklärt werden wie eine solche Bindung zustande kommt und dann überprüft werden, ob dieser Ablauf durch die Abwesenheit von pFn beeinflusst wird.

Die anatomisch gegebenen Blutabflussrichtungen sind nicht der einzig entscheidende Faktor für das Verteilungsmuster von Metastasen. Bestimmte Organe, abhängig von der Tumorart, werden bevorzugt besiedelt. Ein wichtiger Grund für diese Organselektivität ist die spezifische Bindung von Tumorzellen an Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen des jeweiligen Organs. In verschiedenen Modellen konnten eine Reihe solcher Moleküle identifiziert werden, insbesondere sind hier die Selektine, wie zum Beispiel L-Selektin (Sell, Lu-ECAM 1), zu nennen.^{201, 202} Die Bedeutung der Selektine wurde nicht nur für das Adhären von Leukozyten, sondern auch für die Ansiedlung von Tumorzellen gezeigt.²⁰³ Sie werden dafür auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimiert und können so an Polysaccharid-Gruppen der Tumorzelloberfläche binden. Dieser Vorgang läuft primär ohne eine direkte Beteiligung von pFn ab, kann also folglich auch nicht durch dessen Abwesenheit beeinflusst werden. In dieser Arbeit zeigte sich zudem, dass pFn die Adhäsion von Tumorzellen auch nicht auf indirektem Wege, durch Veränderung der Expressionsmuster der Selektine, fördert. Dazu wurde das Expressionssignal von Selp (P-Selektin) als wichtigem Vertreter der Selektine in beiden Versuchsgruppen im Verlauf untersucht. Es muss hinzugefügt werden, dass Selp neben dem Endothel auch auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten vorkommt, welche ebenfalls in der Situation der adhärenenden Tumorzelle vorhanden sind.²⁰⁴ Jedoch darf deren Einfluss bei den durchgeführten RNA-Analysen außer Acht gelassen werden, da Thrombozyten als kernlose Zellen keine RNA-Produktion mehr besitzen und somit nicht auf äußere Gegebenheiten mit einer Steigerung der RNA-Konzentration

reagieren können. Bei großer Varianz der Daten zeigten sich in Bezug auf Selp in den Lungen der Versuchstiere nach 48 Stunden höhere Werte in der pFn^{-/-}-Gruppe gegenüber der Kontrolle. Auf Grund der Funktion von Selektinen würde das darauf hindeuten, dass die Tumorzellen in den Tieren ohne pFn besser adhärieren können. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kommt man bei der Expressionsanalyse von Edil3 (auch: Del1), einem endothelialen Faktor, dem im Gegensatz zu den Selektinen anti-adhäsive Eigenschaften zugeschrieben werden.²⁰⁵ Die Messungen zeigten in diesem Fall eine stärkere Expression in der Kontrollgruppe. Die Untersuchungen von Selp und Edil3 würden also für eine erleichterte Adhäsion in Abwesenheit von pFn sprechen. Das erscheint jedoch auf Grund der später weniger auftretenden Metastasen nicht plausibel. Wie können also die Ergebnisse eingeordnet werden? Es ist eher anzunehmen, dass die beiden Befunde eine Reaktion des Endothels auf die bereits nach 24 Stunden größere Anzahl vorhandener Tumorzellen in der Kontrollgruppe darstellen. Das heißt, das Endothel in der Kontrollgruppe kann auf den größeren Schaden durch die vermehrte Besiedlung durch Tumorzellen mit einem entsprechend stärker ausgeprägten anti-adhäsiven Expressionsmuster reagieren. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich auf jeden Fall kein Hinweis darauf, dass pFn seine Metastasen fördernde Wirkung über die Expressionssteigerung von Selp, beziehungsweise Suppression von Edil3 erlangt.

Neben den Selektinen gibt es auf Endothelzellen noch weitere Proteine, die über Bindung von Oberflächenmolekülen eine Adhäsion von Tumorzellen bewirken können. So wirkt zum Beispiel die Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP-IV) neben seiner enzymatischen Funktion auch als Transmembranrezeptor für Glykoproteine anderer Zellen. Diese Eigenschaft ist insofern von besonderem Interesse, da DPP-IV auch in der Lage ist, pFn zu binden. Zum besseren Verständnis dieser Bindung muss zunächst prinzipiell die Struktur von pFn erläutert werden. Plasmatisches Fibronectin liegt im Plasma in einer Konformation vor, bei der die meisten der theoretisch vorhandenen Bindungsstellen, unter anderem auch die für DPP-IV, verborgen bleiben. Dadurch wird eine spontane, ungewollte Bindung an Endothel, oder auch Thrombozyten und folgend eine Thrombosierung von Gefäßen verhindert.¹⁰⁴ Unter gewissen Umständen jedoch kann pFn seine Struktur verändern und so die verborgenen Bindungsstellen freigeben. Dies geschieht zum Beispiel durch Veränderung der Ionenkonzentration oder des pH-Wertes vor Ort.¹³⁴ Es ist anzunehmen, dass es im Falle des Metastasenmodells durch die vom

Tumorzellembolus verursachte Ischämie zu einer diesbezüglichen Abweichung und damit zur Umformung von pFn kommt. Eine zweite Möglichkeit, die Konformation von pFn zu ändern, geschieht durch die Einwirkung von mechanischer Kraft. Dies ist bisher nur für cFn gezeigt worden,¹¹³ doch es ist anzunehmen, dass auch an einer im Gefäß steckenden Tumorzelle im noch verbliebenen Restfluss des Blutes enorme Scherkräfte wirken, die die Struktur von pFn mechanisch ändern können. Der wichtigste Weg, die nicht sichtbaren Kontaktstellen von pFn zugänglich zu machen, liegt in der Bindung von pFn an andere Strukturen, wie Kollagen, Heparin oder auch Fibronectin auf der Oberfläche von Tumorzellen.^{109, 136, 206} Durch die Verwendung einer Bindungsstelle kommt es zur Umgestaltung der räumlichen Struktur und damit zur Offenlegung zuvor verborgener Fibronectinanteile. Es kann also davon ausgegangen werden, dass nach Bindung von pFn an die Tumorzellen andere Bindungsstellen wie zum Beispiel für DPP-IV zugänglich werden.

In Bezug auf DPP-IV spielt die Verfügbarkeit der Bindungsstellen nun in folgendem Adhäsionsmodell eine Rolle, das von B.U. Pauli et al. entwickelt wurde.^{130, 136} Eine Tumorzelle präsentiert während der intravasalen Phase der Metastasierung an seiner Oberfläche selbst produziertes Fibronectin. Aus dem Plasma kommt es zur weiteren Anheftung von pFn an das schon vorhandene cFn, wodurch pFn seine Struktur verändert und so die Bindungsstelle für die endotheliale DPP-IV freigibt. DPP-IV, auch bekannt als CD26, ist ein Transmembranprotein, das unter anderem in Lungenendothelien vorkommt.¹⁴⁸ Pauli et al. gehen davon aus, dass die hämatogen metastasierende Tumorzelle an der DPP-IV der Lungenendothelien adhärert und anschließend eine Metastase ausbilden kann. Dementsprechend konnten die Metastasenzahlen in der Lunge nach intravenöser Tumorzellinjektion durch Gabe von Peptiden, die die Bindung von Fn an DPP-IV kompetitiv hemmen, deutlich reduziert werden.¹⁴⁷ Für diese Arbeit entscheidend ist, dass in dem beschriebenen Adhäsionsmodell genau dem pFn eine ausschlaggebende Rolle zukommt. Damit könnte ebenfalls die Reduktion der Metastasenzahl bei einem Knockout von pFn erklärt werden. Die eigenen Ergebnisse und die Charakterisierung von Tumorzellen und Versuchstieren weisen darauf hin, dass die pFn-vermittelte Adhäsion von Tumorzellen an DPP-IV in dieser Arbeit ebenfalls eine Rolle spielt. Die Analyse des Überstands der Tumorzellkultur mittels Western Blot zeigt ein deutliches Signal für Fn, das heißt die

Tumorzellen können eigenes Fn produzieren. Zudem beweisen die durchflusszytometrischen Bestimmungen, dass die Tumorzellen die Fähigkeit haben, aus dem Plasma pFn an sich zu binden, welches dann in gebundener Form die Bindungsstelle für DPP-IV frei geben kann. Aus im Internet verfügbaren Genexpressionsprofilen (UniGene Mm.1151) ist ersichtlich, dass sich in Lungen von Mäusen ein Signal für DPP-IV findet, das heißt DPP-IV kann als vorhanden angenommen werden. Diese Fakten zusammen genommen liefern eine wichtige Erklärung, weswegen sich in pFn^{-/-}-Mäusen deutlich weniger Tumorzellen ansiedeln können als in den Kontrollmäusen. Durch das Fehlen von pFn kommt es nicht zu einer weiteren Anheftung von pFn an die Tumorzelloberfläche, wodurch die erste Adhäsion an die Endothelzellen der Lunge über DPP-IV erschwert wird. Als Folge der ausbleibenden Bindung können die Tumorzellen leichter von mechanischen Kräften oder Immunzellen aus der Lunge entfernt werden.

In Analogie zur Leukozytenwanderung stellt die Bindung an Selektine und DPPIV für die wandernden Tumorzellen die erste Form der Interaktion mit dem Endothel dar. Für die feste Adhäsion spielt dann die Integrin vermittelte Anheftung an subendotheliale Schichten die entscheidende Rolle. Integrine sind als Heterodimere grundsätzlich aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit aufgebaut und vermitteln Bindungen von Zellen untereinander und an die EZM. In der EZM können bei entsprechender Zusammensetzung der Integrinuntereinheiten verschiedene Strukturen wie Kollagene, Heparin, aber selbstverständlich auch Fibronectin, in dem Fall zelluläres Fibronectin, erkannt werden. Die Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten D5-Melanomzellen zeigte positive Expressionssignale für eine Reihe von Integrinen, unter anderem für $\alpha 6$, $\alpha 10$, αv , sowie $\beta 1$. Von diesen Integrinen kann angenommen werden, dass sie auf der Tumorzelloberfläche vorhanden sind. Interessanterweise scheint Integrin $\alpha 5$, welches für die Erkennung der RGD-Sequenz von Fibronectin erforderlich ist, nicht verfügbar zu sein. Doch Fibronectin wird von einer Vielzahl weiterer Integrine erkannt, beispielsweise auch von dem vorhandenen Integrin $\alpha v \beta 1$.¹¹¹ Somit besteht für die Tumorzellen die Möglichkeit, über die Integrin vermittelte Bindung an Fibronectin eine feste Adhäsion an das Lungengewebe zu erlangen. Damit übereinstimmend konnte in einem anderen Modell gezeigt werden, dass sich nach Blockade der Integrinbindung mit Hilfe von RGD-Peptiden die Zahl der Metastasen reduzieren ließ.¹⁴² Für diese

Arbeit entscheidend ist die Frage nach der Bedeutung von plasmatischem Fibronectin für die Tumorzellansiedlung. Die beschriebenen Vorgänge der Integrinbindung könnten zunächst auch ohne Beteiligung von pFn ablaufen. Doch pFn kann diese Bindung unterstützen. Plasmatisches Fibronectin kann einerseits an die Tumorzellen binden und hat andererseits Bindungsstellen für fast alle Bestandteile der EZM.^{104, 109} Somit ist ein Einfluss von pFn auf die Stabilisierung der Bindung von Tumorzellen an subendotheliale Strukturen anzunehmen. Inwiefern dieser Mechanismus in den pFn-Knockoutmäusen tatsächlich dazu beiträgt, die Anzahl an Metastasen zu reduzieren, müsste in weiteren Versuchen abgeklärt werden, die sich damit beschäftigen, ob die Metastasierung in den Knockoutmäusen durch die Gabe von RGD-Peptiden weiter zurückgeht, oder ob das Potential durch die Wegnahme von pFn bereits erschöpft ist.

Eine andere Möglichkeit der Tumorzelle, einen festen Halt im Gefäß zu erlangen, besteht in der Abschirmung durch einen stabilen Thrombus. Durch eine induzierte Blockade von Thrombozyten konnte in einer Vielzahl von Versuchen die Metastasen fördernde Funktion eines stabilen Thrombus nachgewiesen werden.^{6, 48, 207} Dabei sorgt der Thrombus für eine Abschirmung gegenüber Immunzellen und mechanischen Kräften des Blutstroms und verschafft der Tumorzelle so mehr Zeit, um aus dem Gefäß ins Lungengewebe zu invadieren. Plasmatisches Fibronectin ist zum einen ein Ligand an Thrombozyten und zum anderen in der Lage, Fibrin zu binden,^{104, 199} weswegen anzunehmen ist, dass sich pFn in den Thromben ansammelt, die nach Tumorzellinjektion in der Lunge entstehen. In den eigenen Versuchen konnte das durch Nachweis eines Anstiegs der Menge des in der Lunge vorhandenen Fibronectins im Zeitverlauf bestätigt werden, wobei das Ausbleiben des Fibronectinanstiegs in den pFn^{-/-}-Mäusen beweist, dass es sich um pFn und nicht um cFn handelt.

Die Ausbildung eines Thrombus beginnt mit der Aktivierung von Thrombozyten durch die Bindung an Strukturen der EZM, welche physiologischerweise nicht aus dem Gefäßlumen zu erreichen wären und somit einen Gefäßschaden signalisieren. Im Anschluss daran sezernieren die aktivierten Thrombozyten eine Reihe von prokoagulatorischen Faktoren und präsentieren auf ihren Oberflächen Rezeptoren, an die Plasmaproteine wie pFn und Fibrinogen gebunden werden können. Über diese Proteine kann eine Vernetzung und eine Aktivierung weiterer Thrombozyten erreicht

werden, die in der Folge einen stabilen Thrombus bilden. Plasmatisches Fibronectin ist also nicht nur in einem Thrombus vorhanden, sondern auch entscheidend an dessen Stabilisierung beteiligt.¹⁰⁸ Versuche mit pFn^{-/-}-Mäusen zeigen dabei, dass weniger die initiale Anheftung der Thrombozyten, sondern mehr die Etablierung beziehungsweise Aufrechterhaltung eines festen, kompakten Thrombus durch die Abwesenheit von pFn beeinträchtigt ist.²⁰⁸ Zu dem gleichen Ergebnis kommen auch Untersuchungen an Mäusen bei denen Fn nur auf jeweils einem Gen ausgeknockt wurde – so genannte Fn^{+/-}-Mäuse –, wo es möglich war, die Stabilität eines Thrombus durch Infusion von zusätzlichem pFn wieder auf Normalniveau zu bringen.²⁰⁹ In den eigenen Messungen konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl an Tumorzellen in der Lunge schon in den ersten Stunden bis Tagen durch die Ausschaltung von pFn deutlich reduziert, also zu der Zeit, in der ein stabiler Thrombus die Tumorzelle umgeben und stabilisieren sollte. Die beeinträchtigte Thrombusbildung in Abwesenheit von pFn scheint die Chancen der Tumorzelle auf eine erfolgreiche Ansiedlung zu reduzieren.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass es in den pFn^{-/-}-Mäusen tatsächlich zu weniger einer geringeren Aktivierung von Thrombozyten kommt, zeigt sich in der geringeren Expression von Snai2 nach 24 und 48 Stunden. Snai2 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Wirkung von Tgf- β vermehrt produziert wird.²¹⁰ Beide Faktoren spielen eine Rolle bei der epidermal-mesenchymalen Transition (EMT), welche die Wanderung von Tumorzellen begünstigt. Für die Interpretation der Messwerte ist wichtig, dass Tgf- β in relevanten Mengen von aggregierten Thrombozyten abgegeben wird, weswegen sich im Umkehrschluss aus einem hohen Snai2-Wert eine hohe Thrombozyten-Aktivität folgern lässt. Da die Snai2-Werte in den Tieren ohne pFn niedriger war, deutet das auf eine geringere Thrombozytenaktivität in Abwesenheit von pFn hin. Noch aussagekräftiger sind aber die mikroskopischen Bilder von Lungenanschnitten zwei Stunden nach Tumorzellinjektion. In den Kontrollmäusen mit pFn ist deutlich eine Einbettung der Tumorzellen in einem Netz aus Fibronectin und Erythrozyten zu sehen. Von Erythrozyten ist auf Grund der Größe der Zellen, sowie einer ausbleibenden Kernanfärbung auszugehen. Zusammen lässt die beobachtbare Struktur ganz klar auf einen Thrombus schließen. Diese Aggregationen finden sich in den durchgeführten Färbungen hingegen nicht in den Knockoutmäusen, wo die Tumorzellen einzeln und in der Umgebung frei erscheinen. Offensichtlich kann der Verlust von pFn nicht

kompensiert werden und führt so zu einem mangelhaften Aufbau eines Thrombus um die Tumorzelle herum. Diese fehlende Abschirmung ist ein wichtiger Grund für die reduzierte Ansiedlung von Tumorzellen in Abwesenheit von pFn.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass pFn großen Einfluss auf die Phase der Metastasierung von der initialen Anheftung der Tumorzelle bis zur Ausbildung einer stabilen Verbindung zum Lungengewebe hat. Dies konnte mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden. Ob pFn darüber hinaus auch an den anschließenden Schritten zur Bildung einer manifesten Metastase beteiligt ist, soll im folgenden Kapitel diskutiert werden.

4.4.3 Intravasales Überleben und Invasion der Tumorzelle

Gelingt der Tumorzelle eine stabile Anheftung ans Lungenendothel, ist für sie die Voraussetzung geschaffen, in das dahinterliegende Gewebe einzudringen. Dafür muss aber zunächst noch das Überleben im Gefäß gesichert werden und der Weg durch Endothel und EZM durch entsprechende Invasionsfaktoren erleichtert werden.

Ein wichtiger Faktor für das Überleben von Tumorzellen ist das Ausmaß der Immunantwort auf die fremden Zellen. Es gibt Hinweise, dass Fibronectin Einfluss auf Immunzellen nehmen kann. So konnte eine Stimulation und Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen durch Fibronectin gezeigt werden.²¹¹ Dabei handelt es sich jedoch um zelluläres Fibronectin. Die Frage ist, ob auch pFn Auswirkungen auf die Immunantwort hat. Tatsache ist, dass es in Abwesenheit von pFn zu einer geringeren Metastasenzahl kommt. Eine mögliche Hypothese lautet also, dass pFn die Tumorzellen weniger immunogen macht und sie so vor einer Immunantwort schützt. Die Konsequenz wäre eine geringere Infiltration des Lungengewebes durch Abwehrzellen und insgesamt weniger ablaufende Entzündungsprozesse. Als Hinweis darauf, ob dies zutrifft wurden hier die Expressionssignale von Markern spezifischer Immunzellen (u.a. CD8a und Gzma) und unspezifischer Entzündung (u.a. Tnfsf10 und IL 6b) in den Versuchsgruppen mit und ohne pFn bestimmt. Insgesamt zeigen Kontroll- und Knockoutgruppe einen relativ ähnlichen Verlauf, sowohl in Bezug auf unspezifische, wie auch spezifische Immunantwort. Zwischen den Gruppen ergaben sich keine einheitlichen Unterschiede. Tendenziell erscheinen die Werte in der Kontrollgruppe, insbesondere nach 48 Stunden, etwas höher. In der Kontrollgruppe finden sich aber zu

diesem Zeitpunkt und auch zehn Tage später wesentlich mehr Tumorzellen, was weitestgehend ausschließt, dass in dem hier verwendeten Modell die Immunantwort eine entscheidende Rolle zur Bekämpfung der Tumorzellen spielt. Aus den hier durchgeführten Messungen zu Markern des Immunsystems ergeben sich also keine Hinweise, dass es durch die Ausschaltung von pFn zu einer relevanten Veränderung der Immunantwort auf die Tumorzellansiedlung kommt.

Unabhängig vom Immunsystem besteht für die Tumorzelle im Gefäß zusätzlich die Gefahr, auf Grund des fehlenden Kontaktes zu anderen Zellen oder Bestandteilen der EZM in Apoptose zu gehen. Dieser Vorgang wird anschaulich als Anoikis – die Vereinsamung – bezeichnet. Normalerweise gehört die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Anoikis für metastasierende Tumorzellen noch vor der Intravasation zu einem der Schlüsselschritte während der Ablösung vom Primärtumor.¹³ In dem hier verwendeten Modell jedoch werden diese ersten Phasen der Metastasierung durch die intravenöse Injektion der Tumorzellen umgangen, wodurch der fehlende Kontakt der Tumorzelle im Gefäß zu anderen Zellen, oder Strukturproteinen von Bedeutung sein könnte. Eines der Moleküle, das über die Bindung von Integrinen ein Überlebenssignal an die isolierten Tumorzellen weiterleiten kann, ist Fibronectin.¹²⁴ Wie im letzten Kapitel ausgeführt, ist davon auszugehen, dass neben dem cFn der EZM auch die plasmatische Variante von Fibronectin am Ort der Tumorzelle mit sämtlichen Bindungsstellen zur Verfügung steht. Zudem kann an Hand der Charakterisierung durch Genexpressionsarrays davon ausgegangen werden, dass die verwendeten D5-Melanomzellen Integrinrezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren, die pFn erkennen können. Es lässt sich also die Vermutung aufstellen, dass die Reduzierung der Tumorzellzahl in den pFn^{-/-}-Mäusen gegenüber den Kontrollmäusen auf mehr Apoptose in Zusammenhang mit Anoikis zurückzuführen ist, da kein pFn mehr für eine Aktivierung von Integrinrezeptoren zur Verfügung steht. Um diese Aussage zu überprüfen, wurden Indikatoren bestimmt, die das Ausmaß der Apoptose vor Ort anzeigen. Nimmt man an, dass in den Lungen der pFn^{-/-}-Mäuse tatsächlich mehr Tumorzellen apoptotisch absterben, so würde man dort auch mehr phagozytierende Zellen erwarten, welche die toten Tumorzellen abräumen. Zwei Rezeptoren die von Phagozyten zur Erkennung apoptotischer Zellen exprimiert werden sind CD36 und Msr1.²¹² Bestimmt man nun die Stärke der Expressionssignale von CD36 und Msr1 in

der Lunge, erhält man einen Rückschluss auf die Anzahl vorhandener phagozytierender Zellen. In den hierzu durchgeführten Messungen zeigte die Expression von CD36 und Msr1 nach 48 Stunden beide Male in der Kontrollgruppe, also in der Gruppe mit pFn, eindeutig höhere Werte. Das heißt, es kommt in Abwesenheit von pFn zu einer verringerten Ansammlung phagozytärer Zellen als Hinweis auf verringerte apoptotische Zellen. Die höheren Werte in der Kontrollgruppe sind am ehesten damit zu erklären, dass zu diesem Zeitpunkt auf Grund der anderen Auswirkungen von pFn schon eine höhere Anzahl an Tumorzellen in der Lunge vorhanden ist. Von diesen stirbt im Rahmen der Ansiedlung ein bestimmter Prozentsatz ab, wodurch aber absolut gesehen mehr Apoptosen in der Kontrollgruppe stattfinden, weil dort insgesamt wesentlich mehr Tumorzellen vorhanden sind. Zudem verursacht die höhere Tumoralast in der Kontrollgruppe auch einen größeren Schaden an Endothelzellen, der ebenfalls zu mehr Apoptose führt. Insgesamt betrachtet ergeben sich also keine Hinweise darauf, dass es durch die Ausschaltung von pFn zu einem Überlebensnachteil der adhärenz Tumorzelle kommt, weder durch eine vermehrte Immunabwehr, noch durch häufiger auftretende Anoikis.

Damit sich aus einer einzelnen Tumorzelle im Gefäß eine manifeste Metastase im Gewebe entwickeln kann, muss so früh wie möglich der Schritt zur Invasion überwunden werden. Auch für diesen Abschnitt der Metastasierung gibt es aus der Literatur Hinweise, dass pFn daran beteiligt ist. So konnte für pFn gezeigt werden, dass es in-vitro die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen verbessern kann;¹⁹⁹ beziehungsweise verschlechterte sie sich durch die Gabe von RGD-Peptiden, welche die Fibronectinbindungsstellen blockieren können.^{141, 143} In beiden Fällen wurde der Effekt auf die Integrin-vermittelte Möglichkeit der Tumorzelle, Fibronectin zu binden und sich so fortzubewegen, zurückgeführt. Welche Bedeutung dieser Mechanismus in-vivo tatsächlich hat, ist aus diesen Untersuchungen nicht sicher zu beurteilen. Denn in-vivo kommen neben den direkten Verbindungen von pFn mit der Tumorzelle auch die indirekten Einflüsse von pFn auf andere Zellen, wie zum Beispiel Thrombozyten, zum Tragen. Um diese Frage zu beantworten, muss in diesem Abschnitt zunächst geklärt werden, wie die Mobilität von Tumorzellen überhaupt gemessen werden kann und anschließend, ob ein Zusammenhang mit pFn besteht. Ein genereller Hinweis auf mobile, invadierende Tumorzellen ist der Wechsel von einem epithelialen zu einem

mesenchymalen Erscheinungsbild (EMT). Mit dieser Veränderung verbinden sich für die Tumorzelle erhöhte Chancen, die Endothelbarriere überwinden und in die EZM eindringen zu können. Als Expressionsmarker, die eine EMT anzeigen, wurden hier Snai2 und Vim gewählt. Vim scheint insbesondere in Melanomzelllinien mit hämatogener Metastasierung überexprimiert und folglich mit einer guten Invasion verbunden zu sein.²¹³ Sowohl Snai2 als auch Vim sind im Zeitverlauf in den Lungen der Kontrollmäuse höher vorhanden. Das heißt, die Abwesenheit von pFn scheint die Tumorzellen in ihren Möglichkeiten zur Mobilität und damit zur Invasion zu beeinträchtigen. Eine Erklärung dafür auf welche Weise pFn diese Wirkung erzielt, ist die schon beschriebene verringerte Thrombozytenaggregation in den pFn^{-/-}-Mäusen. Plasmatisches Fibronectin ist für die Ausbildung eines stabilen Thrombus notwendig. In einem solchen finden sich im Vergleich wesentlich mehr aggregierte und aktivierte Thrombozyten, welche dann unter anderem gespeichertes Tgf- β freigeben.⁵³ Für Tgf- β ist gezeigt, dass es als ein Induktor zur EMT vor allem in fortgeschrittenen Stadien einer Krebserkrankung invasions- und Metastasen fördernd wirkt.²¹⁴⁻²¹⁶ In dem angewandten Mausmodell sorgt also pFn indirekt, vermutlich über ein vermehrtes Freisetzen von Tgf- β , für eine erhöhte Mobilität der Tumorzellen, während sich die geringere Thrombozytenaggregation in den pFn^{-/-}-Mäusen als Nachteil für die Invasion erweist. Durch die Bildung eines stabilen Thrombus kann pFn also nicht nur auf die Adhäsion, sondern auch auf die Invasion von Tumorzellen einwirken.

Abgesehen von Tgf- β haben Thrombozyten noch weitere Faktoren gespeichert die eine Invasion von Tumorzellen unterstützen können.²⁰⁷ Dabei findet neben Matrix degradierenden Enzymen insbesondere das für diese Arbeit relevante VEGF-A Beachtung. So konnte gezeigt werden, dass sich von Thrombozyten abgegebenes VEGF-A in einem Thrombus ansammelt.²¹⁷ Da pFn entscheidend an einer stabilen Thrombusbildung beteiligt ist und zudem sogar selbst Bindungsstellen für VEGF-A besitzt,^{218, 219} ist anzunehmen, dass sich im Umkreis der Tumorzellen in den pFn^{-/-}-Mäusen weniger VEGF-A befindet als in den Kontrollmäusen. VEGF-A wiederum ist in der Lage, Lücken im Endothel zu schaffen und so die Invasion von Tumorzellen zu fördern, was den Metastasierungs-vorteil der Kontrollmäuse gegenüber den pFn^{-/-}-Mäusen miterklären könnte. Um dies zu überprüfen, wurden die Mengen an VEGF-A in Lungenlysaten der Kontroll- und der Knockoutmäuse 24 Stunden nach

Tumorzellinjektion miteinander verglichen. Da hauptsächlich von einer Ansammlung und nicht von einer Neuproduktion von VEGF-A ausgegangen wird, wurde die tatsächlich vorhandene Menge mit ELISA und nicht das Expressionssignal durch PCR-Analyse bestimmt. Das Ergebnis zeigt allerdings keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Das heißt die Auswirkungen von pFn auf die Menge an lokal verfügbarem VEGF-A, durch Thrombozyten-Aktivierung und direkte Bindung von VEGF-A, sind zu gering, um in den ELISA-Messungen sichtbar zu werden. Das erklärt sich unter anderem durch die beständige Sekretion von VEGF-A durch Endothelzellen, wodurch ein relativ hohes Basisniveau erreicht wird und der Beitrag von pFn nicht ins Gewicht fällt.

Neben den unmittelbar Beteiligten, wie Tumor- oder Endothelzellen, wirken an der Ausbildung einer metastatischen Nische auch Zellen aus dem Knochenmark (Bone marrow derived cells; BMDCs) mit, indem sie an den Ort der entstehenden Metastase einwandern können. Dort sorgen sie hauptsächlich durch Umgestaltung des umgebenden Gewebes für ein besseres Einnisten und ein leichteres Vordringen der Tumorzelle in das Lungenstroma.²²⁰ Von Kaplan et al. wurde beschrieben, dass BMDCs, in diesem Falle hämatopoetische Stammzellen (HPCs), über den Fibronectinrezeptor VLA-4 an den Ort der Metastase binden können.⁵⁸ Es ist dabei unklar, ob die HPCs unmittelbar an cFn binden können, da es für die wandernde Zelle zunächst hinter der Endothelschicht verborgen ist. Wie schon zuvor in Bezug auf die wandernden Tumorzellen ausgeführt, kann pFn hier als Überbrückungsmolekül die Adhäsion unterstützen. Es wurde dementsprechend in dieser Arbeit untersucht, ob sich ein Knockout von pFn auf die BMDCs am Ort der Metastasenbildung auswirkt. Dazu wurden in den Lungen der Versuchstiere Expressionsanalysen von Genen durchgeführt, die von BMDCs konstant exprimiert werden und somit das Vorhandensein von BMDCs anzeigen. Als solche Gene wurden hier Kit und Cxcr4 gewählt. Durch die geringeren Expressionssignale beider Marker in der Knockoutgruppe lässt sich ableiten, dass ohne pFn weniger BMDCs in der Lunge auftauchen. Die Frage ist, wie pFn die Menge an BMDCs vor Ort beeinflussen kann. Dafür kommt zunächst der beschriebene Mechanismus der direkten Bindung der BMDCs an Fibronectin in Frage. Fehlt pFn können die BMDCs schlechter am Ort der Metastase adhären und sind somit insgesamt nur in geringerer Zahl vorhanden. Eine weitere Einwirkung von pFn auf

BMDCs kann durch die verstärkte Aktivierung von Thrombozyten geschehen. Aggregierte Thrombozyten setzen neben vielen anderen Faktoren auch CXCL12 in relevanten Mengen frei.²²⁰ CXCL12 ist ein Ligand für CXCR4 und so sorgt ein großes Angebot an CXCL12 aus den Thrombozyten für eine Chemoattraktion von CXCR4-positiven BMDCs.

Neben den beschriebenen Mechanismen beeinflusst der Knockout von pFn die Anzahl von BMDCs auch indirekt, und zwar dadurch, dass ohne pFn aus den bereits benannten Gründen insgesamt weniger Tumorzellen überleben. Tumorzellen selber können CXCL12 sekretieren, weshalb es bei weniger Tumorzellen auch zu weniger CXCL12-Produktion kommen wird. Das führt schließlich zu einer geringeren Zahl an BMDCs in der Lunge. Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht das geringere Expressionssignal von *Cxcl12* in den Lungen der pFn^{-/-}-Mäuse 24 und 48 Stunden nach Tumorzellinjektion. Es bleibt somit festzuhalten, dass sich die Ausschaltung von pFn auch auf die Anzahl von BMDCs am Ort der entstehenden Metastase auswirkt.

Abgesehen von der Anzahl der BMDCs ist vor allem deren Aktivität für die Förderung der Metastasenbildung von Bedeutung. Als Haupteffektoren der BMDCs gelten dabei MMPs; vor allem MMP9 wird mit der Bildung einer metastatischen Nische in Zusammenhang gebracht.⁶⁰ Um zu überprüfen, ob pFn hierauf einen Einfluss hat, wurden als indirekte Marker für die Aktivität von BMDCs die Expressionssignale von *Mmp9* und *Mmp2* in pFn-Knockout- und Kontrollmäusen nach Injektion von Tumorzellen gemessen. Dabei konnte bei *Mmp9* keine Differenz zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dagegen ergibt sich bei *Mmp2* geringere Expressionswerte in der Knockoutgruppe, was auf eine geringere Zahl aktiver BMDCs in der Knockoutgruppe hinweisen würde. In der Zusammenschau beider Messungen muss aber festgehalten werden, dass sich kein klarer Beleg dafür finden lässt, dass pFn einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität von BMDCs hat.

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel deutlich, dass pFn neben seiner Bedeutung für eine erfolgreiche Adhäsion auch an der Invasion einer Tumorzelle beteiligt ist. Während dabei die Rolle der BMDCs auf Grund der uneinheitlichen Expressionsmuster der *Mmps* noch weiterer Untersuchungen bedarf, scheint sich vor allem der Einfluss

von pFn auf die Thrombozytenaggregation positiv auf den Fortschritt der Tumorzelle zur Entwicklung einer Metastase auszuwirken.

In den vorangegangenen Kapiteln wurde jeweils diskutiert, inwieweit pFn an den einzelnen Abschnitten der Metastasierung, vom Transport der Tumorzelle im Blutstrom bis zur Invasion ins Lungengewebe, beteiligt ist. Um die Vielzahl der gewonnenen Informationen nun noch einmal in einen Gesamtzusammenhang zu bringen – auch im Hinblick auf die zuvor diskutierten Faktoren VEGF-A und PlGF –, soll im folgenden Kapitel ein abschließender Überblick über den Ablauf der hämatogenen Metastasierung erfolgen, wie er sich aus den hier gewonnenen Erkenntnissen ergibt.

4.5 Abschließender Überblick

Metastasierung ist ein Prozess, der sich in mehrere Phasen – von der Loslösung am Primärtumor bis zur Angiogenese im entfernten Organ – unterteilen lässt. In dieser Arbeit wurde dabei nur ein ganz bestimmter Abschnitt betrachtet und zwar der Zeitraum vom Eintritt der Tumorzelle ins Gefäßsystem bis zu dem Punkt, an dem sie es schafft, das Gefäß an einer anderen Stelle wieder zu verlassen. Wie aber hat man sich die dazwischen ablaufenden Vorgänge vorzustellen? Ein gutes Bild davon können intravitalmikroskopische Betrachtungen liefern. Besonders aufschlussreich sind dabei die Ergebnisse von Kienast et al., die den Verlauf einzelner Tumorzellen über Wochen beobachten konnten.²²¹ Dort wurde zwar die Ansiedlung von Tumorzellen im Gehirn untersucht, doch die grundsätzlichen Prinzipien lassen sich auch auf die Situation in der Lunge übertragen.

Unter anderem wurde festgestellt, dass der initiale Arrest der Tumorzelle ausschließlich in Gefäßen mit einem gleichen Durchmesser wie der Tumorzelle stattfindet, also auf ein mechanisches Steckenbleiben zurückzuführen ist. Allerdings schaffen es nur circa 10 % der beobachteten Zellen, mehr als 60 Sekunden an dieser Stelle im Gefäß zu verbleiben, die anderen werden vom Blutfluss weitertransportiert. Es ist aber anzunehmen, dass es im weiteren Blutfluss noch häufiger zu Phasen kommt, in denen die Tumorzelle stillsteht. Mit einem Durchmesser von circa 20 µm wird die Tumorzelle zwangsläufig in einer Kapillare mit 3 – 8 µm Durchmesser zumindest kurzfristig hängenbleiben. Aus dem organspezifischen Auftreten von Metastasen weiß man aber, dass Tumorzellen in

der Lage sein müssen, ein Kapillargebiet auch unbeschadet durchlaufen zu können. Vermutlich gelingt ihnen dies durch Änderung der Zellform, wenn sie dem andauernden Druck des Blutstroms lang genug ausgesetzt sind. Das würde auch mit den Beobachtungen von Kienast et al. übereinstimmen, dass Tumorzellen sich bis 48 Stunden nach initialem Arrest noch von ihrer Stelle lösen und wieder in die Zirkulation übergehen können. Das bedeutet, neben der rein durch die Größenverhältnisse vermittelten ersten Anheftung muss die Tumorzelle für einen dauerhaften Verbleib im Gefäß weitere Bindungen eingehen.

In dem in dieser Arbeit verwendeten Metastasenmodell kommen die Tumorzellen direkt in das Gefäßsystem, umgeben sich während des Transports mit einem pFn-Mantel und landen nur kurze Zeit später in den Arteriolen und Kapillaren der Lunge, wo sie auf ein unvorbereitetes, also intaktes Endothel treffen. Das heißt, als unmittelbarer Bindungspartner kommt für die Tumorzelle primär das Endothel mit seinen Adhäsionsmolekülen in Frage. Interessanterweise ist nun genau das Expressionsmuster dieser Adhäsionsmoleküle organspezifisch ausgeprägt und damit immer nur für bestimmte Tumorzellarten passend, was eine gute Erklärung liefert, warum manche Tumorarten bevorzugt in bestimmte Organe metastasieren. Einer der Rezeptoren, der in der Lunge exprimiert wird und für eine Adhäsion sorgen kann, ist DPP-IV. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass die Tumorzelle mit pFn auf der Zelloberfläche über die Vermittlung von DPP-IV an das Endothel binden kann. In dieser Situation steckt die Tumorzelle dann in einem Gefäß, das sie fast komplett ausfüllt, und durch die Bindung ans Endothel nicht einfach von den Kräften des Blutflusses durch die Kapillare gedrückt werden kann. Folge dieser Tumorzellembolie ist eine Stase des Blutflusses, wodurch es zur Aktivierung von Thrombozyten an der Tumorzelloberfläche und damit zur Thrombusbildung um die Tumorzelle herum kommen kann. Durch die Abschirmung mit einem Thrombus erhält die Tumorzelle einen Schutz gegenüber schädigenden Kräften, wie zum Beispiel dem Blutstrom, und somit bessere Chancen zur Ansiedlung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass pFn sowohl an der Adhäsion ans Endothel, als auch an der Bildung eines stabilen Thrombus ganz entscheidend beteiligt ist. Durch die Ausschaltung von pFn konnte die Anzahl der Tumorzellen in der Lunge schon in den ersten zwei Stunden, also genau während der Zeit, in der die Adhäsion abläuft, signifikant reduziert werden. Da sich

gleichzeitig keine Hinweise auf eine vermehrte Immunantwort oder eine höhere Zahl an apoptotischen Zellen finden ließen, ist davon auszugehen, dass die Tumorzellen ohne pFn schlechter adhärieren konnten und vermehrt aus der Lunge wegtransportiert wurden.

Ein Aspekt, der in diesem Zusammenhang beachtet werden muss, ist die Frage, ob dann nicht bei den pFn^{-/-}-Mäusen in anderen Organen umso mehr Tumorzellen gefunden werden müssten. Die Messungen der Pmel-Expression, als Indikator für D5-Melanomzellen, in Leber, Milz und Niere 24 Stunden und zwölf Tage nach Tumorzellinjektion zeigen jedoch zwischen Knockout- und Kontrollgruppe keine Unterschiede in der Anzahl vorhandener Tumorzellen. Es kommt also trotz des schlechteren Adhärierens in der Lunge nicht zu einer vermehrten Ansiedlung von Tumorzellen in anderen Organen. Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass es zwar durch die aus der Lunge rezirkulierenden Tumorzellen zu einem erhöhten Tumorzellangebot in anderen Organen kommt, doch dort gelten ebenfalls die Nachteile eines fehlenden pFn, wodurch es insgesamt zu keiner gesteigerten Metastasenbildung kommt.

Schafft es die Tumorzelle, in einem Gefäß der Lunge zu verbleiben, hat sich also mit Hilfe von pFn eine stabile Adhäsion der Tumorzelle ans Endothel ergeben, so besteht der nächste Schritt in der Extravasation, beziehungsweise dem Eindringen ins Lungengewebe. Kienast et al. haben für Melanomzellen gezeigt, dass diese Vorgänge innerhalb der ersten drei Tage nach Arrest im Gefäß stattfinden müssen, damit sich später eine manifeste Metastase entwickeln kann. Das heißt, den Tumorzellen bleibt nur ein begrenztes Zeitfenster, um die Endothelbarriere zu überwinden. Hierbei können die beiden von Tumorzellen produzierten Wachstumsfaktoren VEGF-A und PlGF eine entscheidende Rolle spielen. Der Permeabilitätsfaktor VEGF-A ist in der Lage, Lücken in der Endothelzellschicht zu schaffen, wodurch die Basalmembran und Bestandteile der EZM für die Tumorzelle „sichtbar“ werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, welche enorme Bedeutung PlGF dabei für die Wirkung von VEGF-A hat, indem es das VEGF-A-Signal verstärkt. Bei Ausschaltung von VEGF-A kommt es über die Mehrproduktion von PlGF zu einer Gegenregulation der Tumorzelle. Die Wegnahme von PlGF jedoch kann nicht kompensiert werden und führt so zu einer drastischen

Reduzierung der Metastasen. Die über VEGF-A beziehungsweise PlGF vermittelte Permeabilität des Endothels bietet der Tumorzelle zunächst den Vorteil, eine Integrinbindung mit der EZM des Lungengewebes eingehen zu können, was im Vergleich zu einer Bindung an Endothelzellen als wesentlicher fester gilt.²²² Zusammen mit dem Thrombus reicht die Anheftung ans Endothel in den ersten Stunden bis Tagen aus, doch wenn der Thrombus beginnt, sich wieder aufzulösen – nach circa 24 Stunden – ist eine feste Adhäsion durch Integrine auf der Zelloberfläche für den weiteren Halt notwendig. Dementsprechend ergaben sich in dieser Arbeit Hinweise, dass sich die Ausschaltung von VEGF-A und PlGF bereits nach 48 Stunden in einer verringerten Anzahl an Tumorzellen in der Lunge äußert.

Ein weiterer Vorteil des Zugangs zur EZM besteht für die Tumorzelle natürlich in der direkten Möglichkeit zur Invasion. Mit Hilfe von MMPs kann das umgebende Gewebe so neuorganisiert werden, dass ein Vordringen der Tumorzelle möglich ist. Unterstützend können dabei zum Beispiel BMDCs wirken, die an den Ort der entstehenden Metastase wandern und MMPs produzieren. In dieser Arbeit ergaben sich Hinweise, dass in den Lungen von pFn^{-/-}-Mäusen nach Tumorzellinjektion weniger solcher Zellen vorhanden sind. Einerseits kann pFn die Adhäsion von BMDCs, ähnlich wie die von Tumorzellen, fördern, andererseits führt aber auch allein die prinzipielle Reduktion der Tumorzellzahl in den Knockoutmäusen zu weniger Ausschüttung von Botenstoffen, wie CXCL12, und damit zu einer verminderten Attraktion von BMDCs. Welche der beiden Gründe dabei überwiegt bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Leichter fällt die Interpretation bezüglich der Immunreaktion auf die Tumorzellen. Während das Vorhandensein von pFn darauf keinen Einfluss zu haben scheint, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass eine Ausschaltung von VEGF-A und PlGF zu einer stärkeren Immunantwort des Körpers führt. Somit erlangen die Tumorzellen durch Abgabe dieser Faktoren einen weiteren Überlebensvorteil auf dem Weg zu einer Metastase.

Gelingt der Tumorzelle nach der Adhäsion und der Abwehr der Immunantwort auch die Auswanderung aus dem Gefäß, beginnt ein neuer Abschnitt der Metastasierung, in dem hauptsächlich die Sicherung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung für die proliferierenden Tumorzellen im Mittelpunkt steht. Interessanterweise konnte von

Kienast et al. gezeigt werden, dass die Tumorzellen nach dem Verlassen des Gefäßes zunächst streng perivaskulär bleiben, sich sogar entlang von bestehenden Gefäßen ausbreiten. Dieser Vorgang wird im Gegensatz zur Angiogenese als „cooption“ bezeichnet. Der Einfluss von pFn als im Plasma vorkommender Faktor wird dabei gering bleiben, ganz im Gegensatz zu VEGF-A und PlGF, die als Angiogenesefaktoren weiterhin den Verlauf der Tumorzellen mit bestimmen werden. Diese weiteren Schritte zu untersuchen, war jedoch nicht die Fragestellung dieser Arbeit. Hier sollte es ausschließlich um die Schritte der Metastasierung vor Notwendigwerden einer Angiogenese gehen.

Abschließend sollte die Frage gestellt werden, welche klinische Relevanz die hier gewonnenen Erkenntnisse haben können. In Bezug auf eine Anti-VEGF-A-Therapie wurde schon gesagt, dass insbesondere die Kompensationsmechanismen über den Anstieg von PlGF genauerer Abklärung bedürfen. Möglicherweise können die bisher unbefriedigenden Ergebnisse – gerade auch in Bezug auf Metastasen – durch eine duale Blockierung von VEGF-A plus PlGF verbessert werden. Hierzu gibt es bereits erste Medikamente, wie zum Beispiel Aflibercept, die für fortgeschrittene Tumorerkrankungen zugelassen sind.²²³ Deren langfristige Bedeutung in der Krebstherapie kann aber derzeit noch nicht sicher beurteilt werden.

Wie aber sind die Ergebnisse in Bezug auf pFn zu bewerten? Das in dieser Arbeit verwendete Modell eines Knockouts ist selbstverständlich nicht auf eine klinische Situation übertragbar. Therapeutische Optionen bestünden zum einen in einer kompetitiven Hemmung, wie es durch RGD-Peptide im Mausmodell und auch in bei bestimmten Tumorarten in klinischen Studien gezeigt wurde,²²⁴ zum anderen in einer funktionalen Blockierung. Dafür müsste ein Molekül gefunden werden, das durch die Bindung an pFn eine ordnungsgemäße Entfaltung und damit die Funktionsfähigkeit von pFn verhindert. Daneben sind aber auch diagnostische Einsatzmöglichkeiten von pFn denkbar. Es konnte hier sowohl durch Western Blot als auch durch mikroskopische Auswertungen gezeigt werden, dass sich pFn gezielt um metastasierende Tumorzellen ansammelt. Durch Verabreichung von markiertem pFn, zum Beispiel Positronen emittierend, könnten mit Hilfe von PET schon frühe Stadien der Tumorzellansiedlung in fremden Organen detektiert und dadurch die Therapieoptionen verbessert werden.

Diese Überlegungen sind noch vorausgreifend, sollen aber deutlich machen, welches Potential zur Verbesserung der Metastasentherapie in dem Ergebnis dieser Arbeit liegt, dass pFn ganz entscheidend an der Ausbildung einer metastatischen Nische beteiligt ist.

5 Zusammenfassung

Die Bildung von Metastasen ist ein komplexer Prozess, bei dem in jedem der nacheinander ablaufenden Schritte ganz spezielle Anforderungen an die Tumorzellen gestellt werden, um zu überleben und letztendlich zu einer Tochtergeschwulst wachsen zu können. In der Phase der Ansiedlung, im Anschluss an die hämatogene Streuung, kommt es für die Tumorzelle zunächst auf eine erfolgreiche Adhäsion an das Endothel des Zielorgans und dann auf ein Verlassen des Blutgefäßes an. Zwei Faktoren, die auf Grund ihrer Eigenschaften als Adhäsions- beziehungsweise Permeabilitätsfaktoren hierbei eine wichtige Rolle spielen können, sind das plasmatische Fibronectin und die Wachstumsfaktoren VEGF-A und PlGF. Es wurde deshalb in dieser Arbeit untersucht, welche Auswirkungen die Blockade dieser Faktoren auf das Überleben metastasierender Tumorzellen hat.

Es wurde hierfür ein Metastasenmodell mit D5-Melanomzellen und C57-Bl6-Mäusen verwendet. Zwölf Tage nach intravenöser Injektion der Zellen wurden die Tiere getötet und die entnommenen Organe, allen voran die Lunge als erstem Organ im venösen Abfluss, untersucht. Es wurden unter anderem die sichtbaren Metastasen gezählt, histologische Färbungen durchgeführt und mit Hilfe von RNA-Isolierung und RT-PCR die RNA-Expressionsmuster analysiert. Um die Fragen zu VEGF-A beziehungsweise PlGF zu beantworten, wurde die Produktion dieser Faktoren in den Tumorzellen mit Hilfe von siRNA unterdrückt. Für die Versuche zu pFn wurden transgene, konditionelle Fn-K.o.-Mäuse verwendet, wodurch eine Ausschaltung von pFn erreicht werden konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der VEGF-A-Produktion in den Tumorzellen zu einer signifikanten Reduktion der Metastasenzahl in der Lunge führt. Dabei zeigte sich keine vermehrte Ansiedlung von Tumorzellen in nachgeschalteten Organen. Da bei der Blockade von VEGF-A in-vitro ein deutlicher Anstieg der PlGF-Sekretion gesehen wurde und PlGF ähnliche Eigenschaften wie VEGF-A zugeschrieben werden, wurde in einem weiteren Versuch die Produktion von PlGF mit siRNA unterdrückt. Dadurch wurde eine noch deutlichere Reduktion der Metastasen erreicht, die auch durch eine gleichzeitige Blockade von VEGF-A und PlGF nicht weiter gesteigert werden konnte. Wie kann nun die Metastasen fördernde Wirkung von VEGF-

A bzw. PlGF erklärt werden? In Bezug auf die Vitalität und die Proliferation der Tumorzellen wurden keine Unterschiede gefunden. Da beide Faktoren von den Tumorzellen produziert werden, ist von einem lokalen Effekt auszugehen. Zudem ergaben sich in dieser Arbeit Hinweise, dass sich das Fehlen der Faktoren schon innerhalb der ersten 48 Stunden nach Injektion auswirkt, also während der Phase der Adhäsion. Am ehesten scheinen die Permeabilitätsfaktoren VEGF-A und PlGF dabei die Interaktion der Tumorzelle mit dem Endothel entscheidend zu beeinflussen. Durch die geschaffenen Endothellücken gelingt der Tumorzelle eine bessere Adhäsion und schließlich die Extravasation.

Da für VEGF-A ein Zusammenhang mit der Ansammlung von Fibronectin (Fn) bei der Bildung einer metastatischen Nische diskutiert wird, wurde hier die Rolle von Fn im Rahmen der Metastasierung untersucht. Fibronectin existiert in zwei Varianten, als zelluläres Fn (cFn) und als plasmatisches Fn (pFn). Da cFn für die ankommende Tumorzelle zunächst hinter der Endothelschicht verborgen ist, wurde hier pFn untersucht. Durch Verwendung von K.o.-Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl der Metastasen in Abwesenheit von pFn um ca. 80 % reduziert. Durch RNA-Analyse wurde festgestellt, dass die Tumorzellen ohne pFn bereits in den ersten 48 Stunden einen signifikanten Überlebensnachteil haben. Als Ursachen hierfür ergab sich zum einen die mangelhafte Ausbildung eines Thrombus, der die Tumorzelle vor mechanischen Kräften und der Immunabwehr abschirmt. Zum anderen wurde im FACS nachgewiesen, dass die Tumorzellen normalerweise in der Lage sind, pFn an sich zu binden, wodurch eine Adhäsion an spezifische (sub-)endotheliale Strukturen ermöglicht wird.

In dieser Arbeit konnte eindeutig der Einfluss von VEGF-A/PlGF und pFn auf die Tumorzellansiedlung gezeigt werden. Für VEGF-A bedeutet dies, dass es nicht erst im Rahmen der Angiogenese, sondern auch schon in früheren Phasen von Bedeutung ist. Nach den hier gewonnenen Erkenntnissen sollte eine gegen VEGF-A gerichtete Therapie zudem auf PlGF ausgedehnt werden, um einer Ersatzaktivierung vorzubeugen. In Bezug auf pFn wurde hier das Potential zur Reduktion der Metastasen gezeigt, so dass eine therapeutische Blockade von pFn, zum Beispiel durch RGD-Peptide, sehr aussichtsreich scheint.

6 Literaturverzeichnis

1. Eckart WU. *100 Years of Organized Cancer Research: Proceedings of the Symposium, Heidelberg, February 2000*; Georg Thieme Verlag; 2000.
2. Weber J, Spring A, Czarnetzki A. [Parasagittal meningioma in a skull dated 32500 years before present from southwestern Germany]. *Dtsch Med Wochenschr.* Dec 20 2002;127(51-52):2757-2760.
3. Hiddemann WH, Heinz; Bartram, Claus R. *Die Onkologie: Band 1*. Berlin: Springer Verlag; 2004.
4. Todesursachen in Deutschland 2007: Statistisches Bundesamt Deutschland 2008.
5. The Global Burden Of Disease - 2004 Update: World Health Organization; 2008.
6. Weinberg RA. *The biology of cancer*. Vol 1. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2007.
7. Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev.* May 2007;28(3):297-321.
8. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature.* Jan 10 1980;283(5743):139-146.
9. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* Jan 7 2000;100(1):57-70.
10. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* May 2003;3(5):362-374.
11. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* Aug 2006;12(8):895-904.
12. Tsuruo T, Fujita N. Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2008;84(6):189-198.
13. Reddig PJ, Juliano RL. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev.* Sep 2005;24(3):425-439.
14. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* Aug 1989;8(2):98-101.
15. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem.* 2006;108(5):327-334.
16. Gimbrone MA, Jr., Leapman SB, Cotran RS, et al. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med.* Aug 1 1972;136(2):261-276.
17. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* Aug 2002;2(8):563-572.
18. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res.* Dec 1 2006;66(23):11089-11093.

19. Weiss L. Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis*. May 1992;10(3):191-199.
20. Adamson IY, Young L, Orr FW. Tumor metastasis after hyperoxic injury and repair of the pulmonary endothelium. *Lab Invest*. Jul 1987;57(1):71-77.
21. Lafrenie R, Shaughnessy SG, Orr FW. Cancer cell interactions with injured or activated endothelium. *Cancer Metastasis Rev*. Nov 1992;11(3-4):377-388.
22. Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, et al. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol*. Feb 2000;190(3):310-329.
23. Anasagasti MJ, Olaso E, Calvo F, et al. Interleukin 1-dependent and -independent mouse melanoma metastases. *J Natl Cancer Inst*. May 7 1997;89(9):645-651.
24. Orosz P, Kruger A, Hubbe M, et al. Promotion of experimental liver metastasis by tumor necrosis factor. *Int J Cancer*. Mar 16 1995;60(6):867-871.
25. Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, et al. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer*. May 16 1997;71(4):612-619.
26. Auerbach R, Alby L, Morrissey LW, et al. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res*. May 1985;29(3):401-411.
27. Auerbach R, Lu WC, Pardon E, et al. Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: an in vitro correlate of preferential metastasis in vivo. *Cancer Res*. Mar 15 1987;47(6):1492-1496.
28. Okahara H, Yagita H, Miyake K, et al. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res*. Jun 15 1994;54(12):3233-3236.
29. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. Jul 28 2005;436(7050):518-524.
30. Minn AJ, Gupta GP, Padua D, et al. Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 17 2007;104(16):6740-6745.
31. Chang YS, Chen YQ, Timar J, et al. Increased expression of alpha IIb beta 3 integrin in subpopulations of murine melanoma cells with high lung-colonizing ability. *Int J Cancer*. May 28 1992;51(3):445-451.
32. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. Feb 1 1991;51(3):794-798.
33. Offner FA, Schiefer J, Wirtz HC, et al. Tumour-cell-endothelial interactions: free radicals are mediators of melanoma-induced endothelial cell damage. *Virchows Arch*. May 1996;428(2):99-106.
34. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs*. 1997;15(1):61-75.
35. Pourgholami MH, Morris DL. Inhibitors of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. Oct 2008;6(4):343-347.

-
36. Kishimoto T, Saito K, Ishikura H. [Mechanism of blood-borne metastasis in relation to the interaction between pancreatic carcinoma and endothelial cells]. *Nippon Rinsho*. Jul 1995;53(7):1765-1769.
 37. Jin L, Yuan RQ, Fuchs A, et al. Expression of interleukin-1beta in human breast carcinoma. *Cancer*. Aug 1 1997;80(3):421-434.
 38. Kurtzman SH, Anderson KH, Wang Y, et al. Cytokines in human breast cancer: IL-1alpha and IL-1beta expression. *Oncol Rep*. Jan-Feb 1999;6(1):65-70.
 39. Gangopadhyay A, Lazure DA, Thomas P. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. *Clin Exp Metastasis*. Nov 1998;16(8):703-712.
 40. Auguste P, Fallavollita L, Wang N, et al. The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation. *Am J Pathol*. May 2007;170(5):1781-1792.
 41. Bidard FC, Pierga JY, Vincent-Salomon A, et al. A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev*. Mar 2008;27(1):5-10.
 42. Glinsky VV. Intravascular cell-to-cell adhesive interactions and bone metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. Dec 2006;25(4):531-540.
 43. Mahalingam M, Ugen KE, Kao KJ, et al. Functional role of platelets in experimental metastasis studied with cloned murine fibrosarcoma cell variants. *Cancer Res*. Mar 15 1988;48(6):1460-1464.
 44. Kunita A, Kashima TG, Morishita Y, et al. The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. *Am J Pathol*. Apr 2007;170(4):1337-1347.
 45. Zoucas E, Jorgensen C, Bengmark S. Hemostasis following inoculation and during spreading of colon carcinoma in the rat. *Cancer Res*. Nov 1986;46(11):5662-5666.
 46. Mehta P, Lawson D, Ward MB, et al. Effect of human tumor cells on platelet aggregation: potential relevance to pattern of metastasis. *Cancer Res*. Jun 15 1987;47(12):3115-3117.
 47. Honn KV, Onoda JM, Diglio CA, et al. Inhibition of tumor cell-platelet interactions and tumor metastasis by the calcium channel blocker, nimodipine. *Clin Exp Metastasis*. Jan-Mar 1984;2(1):61-72.
 48. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, et al. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Thromb Haemost*. Sep 2003;90(3):549-554.
 49. Weiss L, Orr FW, Honn KV. Interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *Faseb J*. Jan 1988;2(1):12-21.
 50. Hanna N. Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice is correlated with low levels of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Int J Cancer*. Nov 15 1980;26(5):675-680.
 51. Hanna N. Inhibition of experimental tumor metastasis by selective activation of natural killer cells. *Cancer Res*. Apr 1982;42(4):1337-1342.

52. Crissman JD, Hatfield JS, Menter DG, et al. Morphological study of the interaction of intravascular tumor cells with endothelial cells and subendothelial matrix. *Cancer Res.* Jul 15 1988;48(14):4065-4072.
53. Honn KV, Tang DG, Crissman JD. Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? *Cancer Metastasis Rev.* Nov 1992;11(3-4):325-351.
54. Im JH, Fu W, Wang H, et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res.* Dec 1 2004;64(23):8613-8619.
55. Chopra H, Fligiel SE, Hatfield JS, et al. An in vivo study of the role of the tumor cell cytoskeleton in tumor cell-platelet-endothelial cell interactions. *Cancer Res.* Dec 1 1990;50(23):7686-7696.
56. Tsuruo T, Watanabe M, Oh-hara T. Stimulation of the growth of metastatic clones of mouse colon adenocarcinoma 26 in vitro by platelet-derived growth factor. *Jpn J Cancer Res.* Feb 1989;80(2):136-140.
57. Vlodavsky I, Eldor A, Haimovitz-Friedman A, et al. Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation. *Invasion Metastasis.* 1992;12(2):112-127.
58. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* Dec 8 2005;438(7069):820-827.
59. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, et al. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol.* Dec 2006;8(12):1369-1375.
60. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* Oct 2002;2(4):289-300.
61. Soltau J, Drevs J. Mode of action and clinical impact of VEGF signaling inhibitors. *Expert Rev Anticancer Ther.* May 2009;9(5):649-662.
62. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* Jun 2003;9(6):669-676.
63. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* Nov 1 2002;20(21):4368-4380.
64. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* Feb 1997;18(1):4-25.
65. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* May 22 1998;273(21):13313-13316.
66. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* Nov 13 1998;273(46):30336-30343.

-
67. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, et al. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer*. Dec 2008;8(12):942-956.
 68. Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Feb 2006;290(2):L209-221.
 69. Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jun 2001;280(6):C1367-1374.
 70. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. Jul 30 1998;394(6692):485-490.
 71. Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. Oct 29 1992;359(6398):843-845.
 72. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*. Jan 1999;13(1):9-22.
 73. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*. Mar 4 1994;269(9):6271-6274.
 74. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, et al. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem*. Oct 27 1995;270(43):25915-25919.
 75. Okada F, Rak JW, Croix BS, et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 31 1998;95(7):3609-3614.
 76. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. Sep 30 2006;39(5):469-478.
 77. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. Jul 6 1995;376(6535):62-66.
 78. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium*. Mar-Apr 2006;13(2):63-69.
 79. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. Feb 10 2005;23(5):1011-1027.
 80. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. Oct 28 1994;269(43):26988-26995.
 81. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. Jul 6 1995;376(6535):66-70.

82. Park JE, Chen HH, Winer J, et al. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. Oct 14 1994;269(41):25646-25654.
83. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, et al. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 4 1998;95(16):9349-9354.
84. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, et al. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res*. May 15 2002;62(10):2749-2752.
85. Lee JC, Chow NH, Wang ST, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*. Apr 2000;36(6):748-753.
86. George DJ, Halabi S, Shepard TF, et al. Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. *Clin Cancer Res*. Jul 2001;7(7):1932-1936.
87. Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, et al. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med*. Jul 2004;98(7):632-636.
88. Longo R, Gasparini G. Challenges for patient selection with VEGF inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol*. Jul 2007;60(2):151-170.
89. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. Aug 2004;25(4):581-611.
90. Bachelder RE, Crago A, Chung J, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res*. Aug 1 2001;61(15):5736-5740.
91. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, et al. Angiogenesis and antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis. *Ann Surg Oncol*. Aug 2003;10(7):722-733.
92. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. Jun 3 2004;350(23):2335-2342.
93. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*. Aug 2008;8(8):579-591.
94. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*. Jun 19 2002;94(12):883-893.
95. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*. Jan 2007;11(1):83-95.
96. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. Jan 7 2005;307(5706):58-62.

-
97. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med.* Oct 1996;2(10):1096-1103.
 98. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood.* Jun 15 2003;101(12):4878-4886.
 99. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* Feb 25 1983;219(4587):983-985.
 100. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature.* Sep 22 2005;437(7058):497-504.
 101. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, et al. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* Jul 1998;111 (Pt 13):1853-1865.
 102. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, et al. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem.* Aug 13 1999;274(33):23463-23467.
 103. Weis S, Cui J, Barnes L, et al. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol.* Oct 25 2004;167(2):223-229.
 104. White ES, Baralle FE, Muro AF. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol.* Sep 2008;216(1):1-14.
 105. McDonald JA. Extracellular matrix assembly. *Annu Rev Cell Biol.* 1988;4:183-207.
 106. Tamkun JW, Hynes RO. Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *J Biol Chem.* Apr 10 1983;258(7):4641-4647.
 107. Owens MR, Cimino CD. Synthesis of fibronectin by the isolated perfused rat liver. *Blood.* Jun 1982;59(6):1305-1309.
 108. Cho J, Mosher DF. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* Jul 2006;4(7):1461-1469.
 109. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* Oct 15 2002;115(Pt 20):3861-3863.
 110. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:375-413.
 111. Labat-Robert J. Fibronectin in malignancy. *Semin Cancer Biol.* Jun 2002;12(3):187-195.
 112. Kaspar M, Zardi L, Neri D. Fibronectin as target for tumor therapy. *Int J Cancer.* Mar 15 2006;118(6):1331-1339.
 113. Smith ML, Gourdon D, Little WC, et al. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.* Oct 2 2007;5(10):e268.
 114. Barkalow FJ, Schwarzbauer JE. Localization of the major heparin-binding site in fibronectin. *J Biol Chem.* Apr 25 1991;266(12):7812-7818.

115. Zhong C, Chrzanowska-Wodnicka M, Brown J, et al. Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J Cell Biol.* Apr 20 1998;141(2):539-551.
116. Ingham KC, Brew SA, Huff S, et al. Cryptic self-association sites in type III modules of fibronectin. *J Biol Chem.* Jan 17 1997;272(3):1718-1724.
117. Pierschbacher MD, Hayman EG, Ruoslahti E. Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell.* Oct 1981;26(2 Pt 2):259-267.
118. Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res.* 1999;76:1-20.
119. Takahashi S, Leiss M, Moser M, et al. The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *J Cell Biol.* Jul 2 2007;178(1):167-178.
120. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* Apr 3 1992;69(1):11-25.
121. Kim S, Bell K, Mousa SA, et al. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol.* Apr 2000;156(4):1345-1362.
122. Serini G, Valdembrì D, Bussolino F. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp Cell Res.* Mar 10 2006;312(5):651-658.
123. Wijelath ES, Rahman S, Murray J, et al. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. *J Vasc Surg.* Mar 2004;39(3):655-660.
124. Danen EH, Yamada KM. Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol.* Oct 2001;189(1):1-13.
125. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, et al. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development.* Dec 1993;119(4):1079-1091.
126. Ryu S, Jimi S, Eura Y, et al. Strong intracellular and negative peripheral expression of fibronectin in tumor cells contribute to invasion and metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Lett.* Nov 1 1999;146(1):103-109.
127. Zucchi I, Mento E, Kuznetsov VA, et al. Gene expression profiles of epithelial cells microscopically isolated from a breast-invasive ductal carcinoma and a nodal metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 28 2004;101(52):18147-18152.
128. Bandyopadhyay A, Elkahloun A, Baysa SJ, et al. Development and gene expression profiling of a metastatic variant of the human breast cancer MDA-MB-435 cells. *Cancer Biol Ther.* Feb 2005;4(2):168-174.
129. Korach S, Poupon MF, Du Villard JA, et al. Differential adhesiveness of rhabdomyosarcoma-derived cloned metastatic cell lines to vascular endothelial monolayers. *Cancer Res.* Jul 1986;46(7):3624-3629.
130. Huang L, Cheng HC, Isom R, et al. Protein kinase Cepsilon mediates polymeric fibronectin assembly on the surface of blood-borne rat breast cancer cells to promote pulmonary metastasis. *J Biol Chem.* Mar 21 2008;283(12):7616-7627.

-
131. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, et al. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 20 1995;92(13):6161-6165.
 132. Saulnier R, Bhardwaj B, Klassen J, et al. Fibronectin fibrils and growth factors stimulate anchorage-independent growth of a murine mammary carcinoma. *Exp Cell Res*. Feb 1 1996;222(2):360-369.
 133. Sechler JL, Schwarzbauer JE. Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *J Biol Chem*. Oct 2 1998;273(40):25533-25536.
 134. Johnson KJ, Sage H, Briscoe G, et al. The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions. *J Biol Chem*. May 28 1999;274(22):15473-15479.
 135. Ugarova TP, Zamarron C, Veklich Y, et al. Conformational transitions in the cell binding domain of fibronectin. *Biochemistry*. Apr 4 1995;34(13):4457-4466.
 136. Cheng HC, Abdel-Ghany M, Elble RC, et al. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J Biol Chem*. Sep 11 1998;273(37):24207-24215.
 137. Humphries MJ, Komoriya A, Akiyama SK, et al. Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type-specific adhesion. *J Biol Chem*. May 15 1987;262(14):6886-6892.
 138. Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Mayumi T. Molecular design of bioconjugated cell adhesion peptide with a water-soluble polymeric modifier for enhancement of antimetastatic effect. *Curr Drug Targets*. Apr 2002;3(2):123-130.
 139. Soszka T, Knudsen KA, Beviglia L, et al. Inhibition of murine melanoma cell-matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD-containing peptide isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris*. *Exp Cell Res*. Sep 1991;196(1):6-12.
 140. Saiki I, Murata J, Matsuno K, et al. Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, poly(RGD), and its analogues. *Jpn J Cancer Res*. Jun-Jul 1990;81(6-7):660-667.
 141. Komazawa H, Saiki I, Aoki M, et al. Synthetic Arg-Gly-Asp-Ser analogues of the cell recognition site of fibronectin that retain antimetastatic and anti-cell adhesive properties. *Biol Pharm Bull*. Oct 1993;16(10):997-1003.
 142. Humphries MJ, Olden K, Yamada KM. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science*. Jul 25 1986;233(4762):467-470.
 143. Saiki I, Koike C, Obata A, et al. Functional role of sialyl Lewis X and fibronectin-derived RGDS peptide analogue on tumor-cell arrest in lungs followed by extravasation. *Int J Cancer*. Mar 15 1996;65(6):833-839.
 144. Pasqualini R, Bourdoulous S, Koivunen E, et al. A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nat Med*. Nov 1996;2(11):1197-1203.
 145. Yi M, Ruoslahti E. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 16 2001;98(2):620-624.

146. Johnson RC, Zhu D, Augustin-Voss HG, et al. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV is an adhesion molecule for lung-metastatic rat breast and prostate carcinoma cells. *J Cell Biol.* Jun 1993;121(6):1423-1432.
147. Abdel-Ghany M, Cheng H, Levine RA, et al. Truncated dipeptidyl peptidase IV is a potent anti-adhesion and anti-metastasis peptide for rat breast cancer cells. *Invasion Metastasis.* 1998;18(1):35-43.
148. Cheng HC, Abdel-Ghany M, Pauli BU. A novel consensus motif in fibronectin mediates dipeptidyl peptidase IV adhesion and metastasis. *J Biol Chem.* Jul 4 2003;278(27):24600-24607.
149. Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, et al. Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med.* Mar 2001;7(3):324-330.
150. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* Jun 1 1993;177(6):1779-1784.
151. Kunes P, Holubcova Z, Kolackova M, et al. Pentraxin 3 (PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:920517.
152. Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* Oct 2003;16(4):637-646.
153. Yin Y, Cao LY, Wu WQ, et al. Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol.* Mar 7 2010;16(9):1086-1092.
154. Tao J, Tu YT, Huang CZ, et al. Inhibiting the growth of malignant melanoma by blocking the expression of vascular endothelial growth factor using an RNA interference approach. *Br J Dermatol.* Oct 2005;153(4):715-724.
155. Wang S, Liu H, Ren L, et al. Inhibiting colorectal carcinoma growth and metastasis by blocking the expression of VEGF using RNA interference. *Neoplasia.* Apr 2008;10(4):399-407.
156. Johnson BF, Clay TM, Hobeika AC, et al. Vascular endothelial growth factor and immunosuppression in cancer: current knowledge and potential for new therapy. *Expert Opin Biol Ther.* Apr 2007;7(4):449-460.
157. Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, et al. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol.* May 1 2001;166(9):5398-5406.
158. Souza DG, Amaral FA, Fagundes CT, et al. The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. *Am J Pathol.* Apr 2009;174(4):1309-1318.
159. Souza DG, Soares AC, Pinho V, et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol.* May 2002;160(5):1755-1765.
160. Murakami T, Cardones AR, Hwang ST. Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J Dermatol Sci.* Nov 2004;36(2):71-78.

-
161. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* Jun 1 2010;16(11):2927-2931.
 162. Xu L, Duda DG, di Tomaso E, et al. Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1alpha, CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer. *Cancer Res.* Oct 15 2009;69(20):7905-7910.
 163. Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res.* Nov 1 2006;66(21):10238-10241.
 164. Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, et al. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* Feb 2009;9(1):32-71.
 165. Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des.* 2004;10(1):39-49.
 166. Bocci G, Man S, Green SK, et al. Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res.* Sep 15 2004;64(18):6616-6625.
 167. Rini BI, Michaelson MD, Rosenberg JE, et al. Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* Aug 1 2008;26(22):3743-3748.
 168. Ebos JM, Lee CR, Christensen JG, et al. Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 23 2007;104(43):17069-17074.
 169. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell.* Nov 2 2007;131(3):463-475.
 170. Green CJ, Lichtlen P, Huynh NT, et al. Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1. *Cancer Res.* Mar 15 2001;61(6):2696-2703.
 171. Torry RJ, Tomanek RJ, Zheng W, et al. Hypoxia increases placenta growth factor expression in human myocardium and cultured neonatal rat cardiomyocytes. *J Heart Lung Transplant.* Feb 2009;28(2):183-190.
 172. Cramer M, Nagy I, Murphy BJ, et al. NF-kappaB contributes to transcription of placenta growth factor and interacts with metal responsive transcription factor-1 in hypoxic human cells. *Biol Chem.* Sep 2005;386(9):865-872.
 173. Pan P, Fu H, Zhang L, et al. Angiotensin II upregulates the expression of placental growth factor in human vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *BMC Cell Biol.* 2010;11:36.
 174. Zhao B, Cai J, Boulton M. Expression of placenta growth factor is regulated by both VEGF and hyperglycaemia via VEGFR-2. *Microvasc Res.* Nov 2004;68(3):239-246.
 175. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, et al. VEGF function for upregulation of endogenous PlGF expression during FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis. *Atherosclerosis.* Sep 2008;200(1):51-57.

176. Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ, et al. Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin Exp Immunol*. Jan 2000;119(1):182-188.
177. Roy H, Bhardwaj S, Babu M, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. *Hum Gene Ther*. Dec 2005;16(12):1422-1428.
178. Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, et al. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J*. Apr 15 2008;411(2):211-226.
179. Miao HQ, Lee P, Lin H, et al. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *Faseb J*. Dec 2000;14(15):2532-2539.
180. Wang L, Mukhopadhyay D, Xu X. C terminus of RGS-GAIP-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis. *Faseb J*. Jul 2006;20(9):1513-1515.
181. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, et al. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem*. Aug 28 1998;273(35):22272-22278.
182. Xu L, Cochran DM, Tong RT, et al. Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res*. Apr 15 2006;66(8):3971-3977.
183. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med*. Jul 2003;9(7):936-943.
184. Cao Y, Chen H, Zhou L, et al. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. Feb 9 1996;271(6):3154-3162.
185. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, et al. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 15 1991;88(20):9267-9271.
186. Loges S, Schmidt T, Carmeliet P. "Antimyoangiogenic" therapy for cancer by inhibiting PlGF. *Clin Cancer Res*. Jun 1 2009;15(11):3648-3653.
187. Parr C, Watkins G, Boulton M, et al. Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur J Cancer*. Dec 2005;41(18):2819-2827.
188. Taylor AP, Goldenberg DM. Role of placenta growth factor in malignancy and evidence that an antagonistic PlGF/Flt-1 peptide inhibits the growth and metastasis of human breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther*. Feb 2007;6(2):524-531.
189. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. Feb 2010;21(1):21-26.
190. Shojaei F, Wu X, Malik AK, et al. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol*. Aug 2007;25(8):911-920.

-
191. Wu FT, Stefanini MO, Mac Gabhann F, et al. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J Cell Mol Med.* Mar 2010;14(3):528-552.
192. Schoenfeld J, Lessan K, Johnson NA, et al. Bioinformatic analysis of primary endothelial cell gene array data illustrated by the analysis of transcriptome changes in endothelial cells exposed to VEGF-A and PlGF. *Angiogenesis.* 2004;7(2):143-156.
193. Luttun A, Brusselmans K, Fukao H, et al. Loss of placental growth factor protects mice against vascular permeability in pathological conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 12 2002;295(2):428-434.
194. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* Jan 2004;4(1):71-78.
195. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* Mar 2006;25(1):9-34.
196. Dikov MM, Ohm JE, Ray N, et al. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol.* Jan 1 2005;174(1):215-222.
197. Lin YL, Liang YC, Chiang BL. Placental growth factor down-regulates type 1 T helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *J Leukoc Biol.* Dec 2007;82(6):1473-1480.
198. Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(8).
199. Malik G, Knowles LM, Dhir R, et al. Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. *Cancer Res.* Jun 1 2010;70(11):4327-4334.
200. Weiss L, Nannmark U, Johansson BR, et al. Lethal deformation of cancer cells in the microcirculation: a potential rate regulator of hematogenous metastasis. *Int J Cancer.* Jan 2 1992;50(1):103-107.
201. Zhu D, Pauli BU. Correlation between the lung distribution patterns of Lu-ECAM-1 and melanoma experimental metastases. *Int J Cancer.* Feb 20 1993;53(4):628-633.
202. Zhu D, Cheng CF, Pauli BU. Blocking of lung endothelial cell adhesion molecule-1 (Lu-ECAM-1) inhibits murine melanoma lung metastasis. *J Clin Invest.* Jun 1992;89(6):1718-1724.
203. Laubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol.* Jun 2010;20(3):169-177.
204. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(4):381-392.
205. Choi EY, Chavakis E, Czabanka MA, et al. Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science.* Nov 14 2008;322(5904):1101-1104.
206. Williams EC, Janmey PA, Ferry JD, et al. Conformational states of fibronectin. Effects of pH, ionic strength, and collagen binding. *J Biol Chem.* Dec 25 1982;257(24):14973-14978.

207. Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther.* Aug 2008;8(8):1247-1255.
208. Ni H, Yuen PS, Papalia JM, et al. Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 4 2003;100(5):2415-2419.
209. Matuskova J, Chauhan AK, Cambien B, et al. Decreased plasma fibronectin leads to delayed thrombus growth in injured arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jun 2006;26(6):1391-1396.
210. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* Jun 2010;15(2):117-134.
211. Ostergaard HL, Ma EA. Fibronectin induces phosphorylation of a 120-kDa protein and synergizes with the T cell receptor to activate cytotoxic T cell clones. *Eur J Immunol.* Jan 1995;25(1):252-256.
212. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* 2009;2(72):re3.
213. Li M, Zhang B, Sun B, et al. A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:109.
214. Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* Sep 2006;25(3):435-457.
215. Yu Q, Stamenkovic I. Transforming growth factor-beta facilitates breast carcinoma metastasis by promoting tumor cell survival. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21(3):235-242.
216. Ehata S, Hanyu A, Hayashi M, et al. Transforming growth factor-beta promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. *Cancer Res.* Oct 15 2007;67(20):9694-9703.
217. Arisato T, Hashiguchi T, Sarker KP, et al. Highly accumulated platelet vascular endothelial growth factor in coagulant thrombotic region. *J Thromb Haemost.* Dec 2003;1(12):2589-2593.
218. Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, et al. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ Res.* Oct 13 2006;99(8):853-860.
219. Wijelath ES, Murray J, Rahman S, et al. Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. *Circ Res.* Jul 12 2002;91(1):25-31.
220. Wels J, Kaplan RN, Rafii S, et al. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev.* Mar 1 2008;22(5):559-574.
221. Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med.* Jan 2010;16(1):116-122.
222. Gassmann P, Enns A, Haier J. Role of tumor cell adhesion and migration in organ-specific metastasis formation. *Onkologie.* Dec 2004;27(6):577-582.

-
- 223.** Gaya A, Tse V. A preclinical and clinical review of aflibercept for the management of cancer. *Cancer Treat Rev.* Aug 2012;38(5):484-493.
- 224.** Reardon DA, Nabors LB, Stupp R, et al. Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin Investig Drugs.* Aug 2008;17(8):1225-1235.

7 Anhang

7.1 Liste der verwendeten Materialien

Verwendete Materialien	Hersteller
Agarose LE, Analytical Grade	Promega Corp.
Albumin bovine serum, Fraktion V (Approx. 99 %)	SAFC
Alexa 488 anti-goat	Invitrogen
Alexa 488 anti-rabbit	Invitrogen
Alexa 546 anti-mouse	Invitrogen
Aminohexansäure, 6-Aminocaproic acid	Sigma
Antifading Mounting Medium, Immunoselect	Dianova
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology
B16 D5 murine Melanomzellen	B. Fox, Portland USA
BD Falcon Tubes	Bioscience
BioPhotometer	Eppendorf
Blotting Grade Blocker, Non-fat Dry Milk	Bio-RAD
Blotting-Apparat, 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit	LKB Bromma
C57 / B1 6 Maus	Charles River, Sulzfeld
CellTracker™ Red CMPTX	Invitrogen
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Digital Camera, Orca-ER, C4742-80 (Western Blot)	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH

Verwendete Materialien	Hersteller
DMDC-Wasser (RNasen frei)	Braun
DNA Isolation Kit, nexttec Genomic	Biozym
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmar
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	Eppendorf
Donkey Serum, Normal	Jackson Immuno Research
Dunkelkammer, Aequoria Dark Box	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH
Easy Reader EAR 400 AT	SLT – Labinstruments, Austria
EDTA, Titriplex III	Merck
FACSort	Becton Dickinson
Filterpapier	Whatman
First-Strand-Puffer (5x)	Gibco BRL
FN H/H Maus	R. Fässler, MPI Martinsried
Gelkammer (RNA- und DNA-Analysen)	MWG – Biotech
Gelkammer (Western Blot), 2050 Midget Electrophoretic Unit	LKB Bromma
GelRed	Biotium Inc.
Hepes, Pufferqualität	AppliChem
Hoechst 33342	Hoechst AG
ImageJ 1.40g	National Institutes of Health, USA
Ketavet	Pfizer
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Loading-Puffer (Western Blot), Roti-Load 1 protein loading buffer (4x concentrated)	Carl Roth GmbH & Co. KG

Verwendete Materialien	Hersteller
MassRuler (6x) Loading Dye Solution	Fermentas
MassRuler Express DNA Ladder, LR Forward (28 ng/μl)	Fermentas
MgCl ₂ (50 mM)	PAN – Systems GmbH
M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Gibco BRL
Natronlauge	Merck
Nitrocellulose Transfer Membran, Protran	BioScience
NucleoSpin RNA II Mini	Machery – NAGEL
Oligo p(dT) ₁₅ – Primer (45 μM)	Boehringer
Page Ruler Prestained Protein Ladder (Marker Western Blot)	Fermentas
PCR – Puffer (10x)	PAN – Systems GmbH
poly(dI-dC)	Sigma-Aldrich
Polyacrylamid Mini Gels (10% Gel)	Pierce
Quantikine Mouse PlGF-2	R&D Systems
Quantikine Mouse VEGF	R&D Systems
Rb-x-Ms Fibronectin	Millipore
RNAlater	Sigma
RNase Free	BioLogical
RNase-Inhibitor (30 U/μl)	Eppendorf
RoboCycler Gradient 40	Stratagene
Rompun	Bayer
RPMI 1640	Lonza

Verwendete Materialien	Hersteller
Salzsäure	Merck
SDS	Serva
Sentrix Mouse-6 Expressions Beadchip	Illumina, San Diego
SigmaPlot 10.0	Systat Software, Inc.
SigmaStat 2.0	Systat Software, Inc.
TAE: 2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA, pH 8,3	Eppendorf
Taq – DNA – Polymerase (5 U/μl)	PAN – Systems GmbH
Tris, Trizma Base	Sigma
Triton, X-100, SigmaUltra	Sigma
Tween 20	Sigma-Aldrich
Wasabi version 1.5	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH
West Femto Trial Kit, SuperSignal	Thermo Scientific
α-Fibronectin, Anti-Fibronectin Polyclonal Antibody	DakoCytomation
α-Melanoma, Monoclonal Mouse Anti-Human Melanoma	Dako
α-VEGF, Purified Polyclonal Goat IgG	R&D Systems

Tab. 7-1

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Bei Abkürzungen die sich auf ein Gen beziehen wird bei der Maus in der Regel der erste Buchstabe groß, die restlichen klein geschrieben. Abkürzungen von Proteinen werden durchweg in Großbuchstaben geschrieben.

Abkürzung	Vollständiger Name
12(S)-HETE	12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid
Actb	Actin beta
Ang2	Angiogenin, ribonuclease A family, member 2
BMDC	Bone marrow derived cell
bp	Basenpaare
Casp3	Caspase 3
CD36	Cluster of differentiation 36
CD8a	Cluster of differentiation 8 antigen
cDNA	Complementary DNA
cFn	Zelluläres Fibronectin
Crp	C-reactive protein
Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Cxcr4	C-X-C chemokine receptor type 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase IV
Edil3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fn	Fibronectin
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Abkürzung	Vollständiger Name
Gzma	Granzyme a
Gzmk	Granzyme k
Hif-1 α	Hypoxia inducible factor 1 alpha
HPC	Haematopoietic progenitor cell
Il-1	Interleukin 1
Il-1 β	Interleukin 1 beta
iNos	Inducible Nitric oxide synthase
ip	Intraperitoneal
Itga [**]	Integrin alpha [entsprechende Nummer]
Itgb [**]	Integrin beta [entsprechende Nummer]
iv	Intravenös
K.o.	Knockout
Kit	Kit oncogene
KlrK1	Killer cell lectin-like receptor subfamily K member 1
Lox	Lysyl oxidase
MMP[**]	Matrixmetalloproteinase [entsprechende Nummer] (Protein)
Mmp[**]	Matrixmetalloproteinase [entsprechende Nummer] (Gen)
mRNA	Messenger RNA
Msr1	Macrophage scavenger receptor 1
NF κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
Nrp[**]	Neuropillin [1 oder 2]
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pdgf	Platelet derived growth factor

Abkürzung	Vollständiger Name
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pFn	Plasmatisches Fibronectin
pFn ^{-/-}	Knockout für plasmatisches Fibronectin
Pgf	Placenta growth factor (Gen)
Plau	Urokinase-type plasminogen activator
Plaur	Urokinase-type plasminogen activator receptor
PlGF	Placenta growth factor (Protein)
PlGF-Gruppe	Gruppe mit siRNA/PlGF-transfizierten Tumorzellen
Pmel17	Melanocyte protein 17
Prf1	Perforin 1
Ptx3	Pentraxin related gene 3
RGD	Aminosäuresequenz: Arginin-Glycin-Aspariginsäure
RipK3	Receptor interacting protein kinase 3
RNA	Ribonukleinsäure
Selp	Selectine, platelet
siRNA/ [**]	Small interfering ribonucleic acid / [gegen die Produktion des hier genannten Proteins gerichtet]
Snai2	Snail homolog 2 (Drosophila)
sVEGFR	Löslicher VEGFR
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
Tgf-β	Transforming growth factor beta
Tie2	Endothelial-specific receptor tyrosine kinase
Tlr4	Toll-like receptor 4
Tnfsf10	Tumor necrosis factor superfamily member 10

Abkürzung	Vollständiger Name
Tnf α	Tumor necrosis factor alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
Vegf[**]	Vascular endothelial growth factor [a-d] (Gen)
VEGF-[**]	Vascular endothelial growth factor [a-d] (Protein)
VEGF-A-Gruppe	Gruppe mit siRNA/VEGF-A-transfizierten Tumorzellen
VegfInh	VEGF-A – Inhibitoren
Vegfr[**]	Vascular endothelial growth factor receptor [1 oder 2] (Gen)
VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor 1 / Flt-1
VEGFR2	Vasculare endothelial factor receptor 2 / Flk-1
Vim	Vimentin
VLA-4	Very late antigen 4
WB	Western Blot

Tab. 7-2

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Abbildung einer metastatischen Nische.....	5
Abb. 3.1: VEGF-A-Konzentrationen im Plasma nach Tumorzellinjektion.....	34
Abb. 3.2: VEGF-A-Konzentrationen im Überstand der Tumorzellkultur.....	34
Abb. 3.3: Verhältnis der Expression Pmel/Actb in der Lunge nach Tumorzellinjektion	35
Abb. 3.4: Bestimmung der VEGF-A-Konzentration im Überstand der Tumorzellen, nach Transfektion mit steigender Menge an siRNA/VEGF-	36
Abb. 3.5: Verhältnis von Metastasenfläche zu Gesamtoberfläche der Lunge in Kontroll- und siRNA/VEGF-A-Gruppe	38
Abb. 3.6: Aufnahme einer Lunge aus der Kontrollgruppe	38
Abb. 3.7: Aufnahme einer Lunge aus der Kontrollgruppe	38
Abb. 3.8: Aufnahme einer Lunge aus der siRNA/VEGF-A-Gruppe	38
Abb. 3.9: Aufnahme einer Lunge aus der siRNA/VEGF-A-Gruppe	38
Abb. 3.10: Konzentration von VEGF-A im Plasma von Kontroll- und Versuchsgruppe im Zeitverlauf	39
Abb. 3.11: Kontrollgruppe, 40x	39
Abb. 3.12: siRNA/VEGF-A-Gruppe, 40x.	39
Abb. 3.13: Konzentration von VEGF-A und PlGF im Überstand, bei Transfektion mit steigender Menge siRNA/VEGF-A	41
Abb. 3.14: Konzentrationen von PlGF und VEGF-A im Überstand der Tumorzellen bei Transfektion mit verschiedenen siRNAs.....	42
Abb. 3.19: Verhältnis der Metastasenfläche zur gesamten Lungenoberfläche in Kontroll- und siRNA/Plgf-Gruppe	43
Abb. 3.20: Konzentration von VEGF-A im Plasma von Kontroll- und siRNA/Plgf-Gruppe	43
Abb. 3.17: Aufnahme einer Lunge aus der Kontrollgruppe	43
Abb. 3.18: Aufnahme einer Lunge aus der Kontrollgruppe	43
Abb. 3.19: Aufnahme einer Lunge aus der siRNA/PlGF-Gruppe	43
Abb. 3.20: Aufnahme einer Lunge aus der siRNA/PlGF-Gruppe	43
Abb. 3.21: Verhältnis der Metastasenfläche zur gesamten Lungenoberfläche bei Transfektion mit verschiedenen siRNAs.....	44

Abb. 3.22 – Abb. 3.36: Expressionsverhältnis verschiedener Gene zu Gapdh in
der Lunge im Zeitverlauf: siRNA/VEGF-A-,
siRNA/PIGF- und Kontrollgruppe

Abb. 3.22: Pmel	46
Abb. 3.23: Casp3	48
Abb. 3.24: RipK3	48
Abb. 3.25: Crp	49
Abb. 3.26: Tnfsf10	49
Abb. 3.27: KlrK1	49
Abb. 3.28: Ptx3	49
Abb. 3.29: CD8a	51
Abb. 3.30: Gzma	51
Abb. 3.31: Prfl	51
Abb. 3.32: Vegfa	51
Abb. 3.33: Plau	52
Abb. 3.34: Lox	52
Abb. 3.35: Mmp9	53
Abb. 3.36: Cxcr4	53

Abb. 3.37 – Abb. 3.46: Expressionsverhältnis verschiedener Gene zu Gapdh im
Zeitverlauf: siRNA/VEGF-A-, siRNA/PIGF- und
Kontrollgruppe

Abb. 3.37: Pmel, Leber	55
Abb. 3.38: Pmel, Milz	55
Abb. 3.39: Tnfsf10, Leber	56
Abb. 3.40: Tnfsf10, Milz	56
Abb. 3.41: KlrK1, Leber	56
Abb. 3.42: KlrK1, Milz	56
Abb. 3.43: Crp, Milz	56
Abb. 3.44: Prfl, Leber	57
Abb. 3.45: Prfl, Leber	57
Abb. 3.46: Gzma, Milz	58

Abb. 3.47: WB; Bestimmung von Fn im Lungenlysats an den Tagen nach Tumorzellinjektion	59
--	----

Abb. 3.48: WB; Bestimmung von Fn in der Tumorzellkultur.....	59
Abb. 3.49: Gelauswertung einer PCR für Mx-Cre	61
Abb. 3.50: WB; Bestimmung von pFn im Plasma induzierter Mäuse	61
Abb. 3.51: Aufnahme einer Lunge aus der Kontrollgruppe	62
Abb. 3.52: Aufnahme einer Lunge aus der Kontrollgruppe	62
Abb. 3.53: Aufnahme einer Lunge aus der pFn ^{-/-} -Gruppe	62
Abb. 3.54: Aufnahme einer Lunge aus der pFn ^{-/-} -Gruppe	62
Abb. 3.55: Mittlere Anzahl der pro Lungenseite sichtbaren Metastasen.....	62
Abb. 3.56: Verhältnis der Metastasenfläche zur Gesamtoberfläche der Lunge	63
Abb. 3.57: Expressionsverhältnis von Pmel/Gapdh in der Lunge.....	63
Abb. 3.58: Expressionsverhältnis von Pmel/Gapdh in verschiedenen Organen.....	64
Abb. 3.59: Expressionsverhältnis von Pmel/Gapdh in der Lunge zu verschiedenen Zeitpunkten	66
Abb. 3.60: Expressionsverhältnis von Pmel/Gapdh in verschiedenen Organen nach 24 Stunden	66
 <u>Abb. 3.61 – Abb. 3.67: Expressionsverhältnis verschiedener Gene zu Gapdh in der Lunge. Kontroll- und pFn^{-/-}-Gruppe.</u>	
Abb. 3.61: Marker unspezifischer Entzündung	68
Abb. 3.62: Marker spezifischer Immunabwehr	69
Abb. 3.63: Marker apoptotischer Zellen	70
Abb. 3.64: Adhäsionsfaktoren	70
Abb. 3.65: Marker für Invasion nach 24 Stunden.....	71
Abb. 3.66: Marker für Invasion nach 24 und 48 Stunden.....	71
Abb. 3.67: Nischen-assoziierte Faktoren	72
 Abb. 3.68: WB; Bestimmung von Fibronectin in Lungenlysaten 24 Stunden nach Tumorzellinjektion	
Abb. 3.69: ELISA; mittlere VEGF-A-Konzentration in Lungenlysaten 24 Stunden nach Tumorzellinjektion.....	74
 <u>Abb. 3.70 – Abb. 3.81: Histochemische Anfärbung von Lungenanschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontroll- und pFn^{-/-}-Gruppe.</u>	
Abb. 3.70: Kontrollgruppe; 40x vergrößert; 2 Stunden	75

Abb. 3.71: pFn ^{-/-} -Gruppe; 40x vergrößert, 2 Stunden	75
Abb. 3.72: Kontrollgruppe; 100x vergrößert, 2 Stunden	75
Abb. 3.73: pFn ^{-/-} -Gruppe; 100x vergrößert, 2 Stunden	75
Abb. 3.74: Kontrollgruppe; 100x vergrößert, 2 Stunden	75
Abb. 3.75: pFn ^{-/-} -Gruppe; 100x vergrößert, 2 Stunden	75
Abb. 3.76: Kontrollgruppe; 40x vergrößert, 24 Stunden	76
Abb. 3.77: pFn ^{-/-} -Gruppe; 40x vergrößert, 24 Stunden	76
Abb. 3.78: Kontrollgruppe; 100x vergrößert, 24 Stunden	76
Abb. 3.79: pFn ^{-/-} -Gruppe; 100x vergrößert, 24 Stunden	76
Abb. 3.80: Kontrollgruppe; 100x vergrößert, 24 Stunden	76
Abb. 3.81: pFn ^{-/-} -Gruppe; 100x vergrößert, 24 Stunden	76
Abb. 3.82: FACS; Fn-Signalintensität der D5-Melanomzellen nach Zugabe von PBS oder pFn-reichem Plasma.....	78

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Für die Histochemie verwendete Antikörper.....	23
Tab. 2-2: Zubereitung der im WB verwendeten Puffer	24
Tab. 2-3: cDNA Synthese-Mix	28
Tab. 2-4: PCR-Mix	28
Tab. 3-1: Auswahl der im Expressionsarray getesteten Gene	80
Tab. 7-1: Liste der verwendeten Materialien	148
Tab. 7-2: Abkürzungsverzeichnis	152
Tab. 7-3: Liste der Primersequenzen	159

7.5 Primersequenzen

Gen	Sense 5'→3'	Antisense 5'→3'	T: °C	bp
Actb	GGACTCCTATGTGGGTGACGAGG	GGGAGAGCATAGCCCTCGTAGAT	64	366
Ang2	CAGCGAGCAGCTACAGTCCATG	GCTCTTGGAGTTGGGTCATGAC	54	202
Casp3	CATTTATGGGACAAATGGGCCT	GCATACAGGAAGTCAGCCTCCA	60	210
CD36	CAGCCCAATGGAGCCATC	CAGCGTAGATAGACCTGC	56	487
CD8a	GATGCTCTTGGCTCTTCCAG	CAGCACTGGCTTGGTAGTAG	54	290
Crp	GGCTCCAACACACATCTGTG	G TTCAGTGCCCGCCAGTTCA	52	301
Cxcl12	ACGCCATGGACGCCAAGGTCGT	AGCCGTGCAACAATCTGAAGGGC	56	193
Cxcr4	ATGACGGACAAGTACCGGCTGC	GGCTGACGTCGGCAAAGATGAAG	54	322
Edil3	ACCCAAGGAGCAAAAAGGATTG	AGCTCACAGCCAAGAAGTTCCA	62	438
Gapdh	TGCCATTTGCAGTGGCAAAGTGG	TTGTCATGGATGACCTTGGCCAGG	60	438
Gzma	GGTGTTGACTGCTGCCCCACT	GGTCCCCTGCACAAATCATG	62 (- 2)	410
Gzmk	GTGCTAACAGCCGCCCACTG	CTTGGTGGTTCCCCAGCCAGT	62 (+ 2)	291

Gen	Sense 5'→3'	Antisense 5'→3'	T: °C	bp
Il1β	GACGTTCCCATTAGACAACCTGCACTAC	GGTACCTTAGGCTCAGAAGGATTTCAGAATTC	58 (± 2)	471
iNos	CACAAGGCCACATCGGATTTC	TGCATACCACTTCAACCCGAG	62 (± 2)	741
Kit	GTGTCCGCTGTGCTGCTCAGCG	CACTGGCATCAGAGTTGGACAC	62	660
KlrK1	GACCTCAAGCCAGCAAAGTG	AGGAAGCTTGGCTCTGGTTC	58 (± 2)	367
Lox	CTGGAGGACACGTCCTGTGACT	AAATTGTGCAGCCTGAGGCATA	62	271
Mmp2	GCTGGGAGCATGGAGATGGA	CTCGGTGGTGCCACACCAGC	58 (± 2)	440
Mmp9	GCACGCCTTGGTGTAGCACA	GTTCGATGTGGTCGCACACC	56	380
Msr1	ATGACAGAGAATCAGAGG	CCCTCTGTCTCCCTTTTC	60	855
Mx-Cre	CATGTGTCTTGGTGGGCTGAG	ATGCTGTTTCACTGGTTATGCG	60 (± 2)	596
Plau	AACTGTGGCTGTCAGAACGGAG	GCTTCTGGTTGTCAGGGTTCCT	62 (-2)	301
Pmel17	CTGGAGTCGGGCTCAGTCAC	CAGCTGGCAGTCTGGGCTCG	62 (± 2)	717
Prf1	CTGAATGGGCTCACAGCTGA	CTCTGTCTGGGTCAGCAGTC	62 (+2)	500
Ptx3	GCGCTGTGCTGGAGGAACT	CCACCACCAACACTAGGGACTG	62	300
RipK3	AGAGGCAAGCACAGGACACATC	GGCCGAACCTGAGGCAGTAGTT	60 (± 2)	320

Gen	Sense 5'→3'	Antisense 5'→3'	T: °C	bp
Selp	GCCTTTGCCTACGACTCCAG	GTCAAGGTACCGAAGGGATC	60	380
Snai2	CAAGCTTTCAGACCCCCATGC	GTGTGAGTTCTAATGTGTCCTTG	60 (± 2)	315
Tie2	CACCGTGCTGTTGGCGTTTCTGA	CTTGATGGCGGCATCCATCCGTA	62	286
Tlr4	AGAGAATCTGGTGGCTGTGG	GATACACCTGCCAGAGACAT	54	570
Tnfsf10	ACCCTGCTTGCAGGTAAAGAGG	CCAGGATTCAATCTTCTGGCCT	60	238
Vegfa	CTACCAGCGAAGCTACTGCC	CCGCTCTGAACAAGGCTCAC	60	310
Vim	GAGAGAAATTGCAGGAGGAGATGC	TGCAGGCGGCCAATAGTGTC	60	541

Tab. 7-3